



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DA  
ALGA MARINHA VERMELHA *Pterocladia capillacea* (S. G. Gmelin)  
Santelices & Hommersand

LUANA MARIA CASTELO MELO SILVA

FORTALEZA

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DA  
ALGA MARINHA VERMELHA *Pterocladia capillacea* (S. G. Gmelin)  
Santelices & Hommersand

Dissertação Submetida à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal  
do Ceará, como Requisito Parcial para a Obtenção do  
Grau de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Norma Maria Barros Benevides

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Vilma Lima

FORTALEZA

2008

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

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S581a Silva, Luana Maria Castelo Melo.

Atividades antinociceptiva e antiinflamatória da lectina da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmelin) Santelices & Hommersand / Luana Maria Castelo Melo Silva. – 2008.

101 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2008.

Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.

Coorientação: Profa. Dra. Vilma de Lima.

1. Lectina de algas marinhas. 2. Ação antimicrobiana. 3. *Pterocladia capillacea*. I. Título.

CDD 572

---

Esta Dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários á obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se á disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

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

---

LUANA MARIA CASTELO MELO SILVA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22 /02/08

---

Dra. NORMA MARIA BARROS BENEVIDES  
Depto. Bioquímica e Biologia Molecular-UFC  
(Orientadora)

---

Dra. VILMA DE LIMA  
Depto. Fisiologia e Farmacologia-UFC  
(Co-orientadora e Conselheira)

---

Dra. MARIA GONÇALVES PEREIRA  
FECLESC – UECE  
(Conselheira)

Dedico esta dissertação a Deus ao meu pai José Wellington Silva  
(*in memoriam*) e a minha mãe Mônica Maria pela dedicação e amor.

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Norma Maria Barros Benevides que nesses últimos sete anos me dedicou atenção, excelente orientação, sendo um exemplo de humildade, solidariedade e companheirismo. Serei eternamente grata por sua amizade e confiança.

À professora Dra. Vilma Lima pela excelente co-orientação em todos os ensaios biológicos. Serei eternamente grata por sua dedicação e paciência.

Aos professores Drs. Vietla S. Rao e Flávia Almeida do Departamento de Fisiologia e Farmacologia desta Universidade pela boa recepção e disponibilização do laboratório para a realização de alguns experimentos.

Ao professor Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães do Departamento de Fisiologia e Farmacologia desta Universidade pela disponibilidade de seu laboratório e a seus bolsistas, pela boa recepção e dedicação.

Aos professores do Departamento de Bioquímica desta Universidade que foram fundamentais em minha formação.

Aos meus amigos do Departamento de Bioquímica pelo apoio e amizade.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório 1000, Márjory Lima, Maria Edna Pereira, Ana Luiza Quinderé, José Ariévil Gurgel, Bruno Pedrosa, Danilo Ricarte, Edfranck Sousa, Érika Bessa, Ismael Nilo, Natássia Ribeiro, Orleandro Carlota, Ticiane Abreu, Ticiane Lima e Ygor Raphael Gomes que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

Em especial aos amigos Kharla Rabelo, Paula Goes e Neyberg Lima pelo apoio e auxílio nos ensaios.

À professora Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas e a todos os seus bolsistas.

À minha amiga Gabriela Almeida de Paula (Gabi), e a todos os meus amigos do Grupo Esperança da Paróquia Nossa Senhora da Glória.

Aos meus familiares (irmã, sobrinho, tios, primos e avó) e ao meu namorado Samuel Ramos, pela paciência e apoio moral.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</b>	xii
<b>RESUMO</b>	xiv
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	16
1.1 Algas Marinhas	16
1.2 Lectina	17
1.2.1 Lectinas de Algas Marinhas	19
1.3 Isolamento e Purificação de Lectinas de Algas Marinhas	20
1.4 Aplicações e Atividades Biológicas de Lectinas de Algas Marinhas	22
1.5 Dor e nocicepção	24
1.5.1 Atividade Antinociceptiva	25
1.5.2 Ensaio Antinociceptivos	26
1.6 Inflamação	27
1.6.1 Células Envolvidas no Processo Inflamatório	29
1.6.2 Mediadores Químicos da Inflamação	31
1.7 Importância dos Vegetais como Fornecedores de Compostos com Ação Farmacológica	33
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	35
<b>3. OBJETIVOS</b>	36
3.1 Geral	36
3.2 Específicos	36

<b>4.</b>	<b>MATERIAS</b>	37
4.1	Algas Marinhas	37
4.2	Animais	37
4.3	Células Sanguíneas	37
4.4	Fármacos e Reagentes	38
<b>5.</b>	<b>MÉTODOS</b>	40
5.1	Extração e Purificação da Lectina (Pc) da Alga Marinha Vermelha <i>Pterocladia capillacea</i>	40
5.2	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	42
5.3	Determinação de Proteína	42
5.4	Determinação da Atividade Hemaglutinante	43
5.5	Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante	43
5.6	Estudo da Atividade Antinociceptiva	44
5.6.1	Teste das Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético	44
5.6.2	Teste da Formalina	47
5.6.3	Teste da Placa Quente	49
5.7	Ensaio da Contratilidade Duodenal <i>in vitro</i>	49
5.8	Estudo da Atividade Antiinflamatória	50
5.8.1	Ensaio da Migração de Neutrófilos Induzida por Agente Quimiotático Indireto (Cg)	50
5.8.2	Ensaio do Edema de Pata Induzido por Carragenina (Cg)	51
5.9	Avaliação da Toxicidade Aguda por Dose Repetida	53
5.10	Análise Bioquímica Enzimática do Plasma	53
5.10.1	Dosagem de Uréia	53
5.10.2	Dosagem de Fosfatase Alcalina	54
5.10.3	Dosagens de Transaminases	54
5.11	Análise Estatística	55



<b>6.</b>	<b>RESULTADOS e DISCUSSÕES</b>	56
6.1	Determinação da Inibição da Atividade Hemaglutinante	56
6.2	Purificação da Lectina (Pc) da Alga Marinha Vermelha <i>Pterocladia capillacea</i>	56
6.3	Estudo da Atividade Antinociceptiva	62
6.3.1	Efeito da Pc no Teste das Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético	62
6.3.2	Efeito da Pc no Teste da Formalina	67
6.3.3	Efeito da Pc no Teste da Placa Quente	71
6.4	Efeito da Pc sobre a Contratilidade Duodenal <i>in vitro</i>	75
6.5	Estudo da Atividade Antiinflamatória	77
6.5.1	Efeito da Pc sobre a Migração de Neutrófilos em Cavidade Peritoneal Induzida por Carragenana	77
6.5.2	Efeito da Pc sobre o Edema de Pata Induzido por Carragenana	80
6.6	Avaliação da Toxicidade Aguda da Pc por Dose Repetida	82
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	85
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	86

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1-** Ensaio de inibição do extrato total da alga marinha vermelha 58  
*Pterocladia capillacea*
- TABELA 2-** Purificação da lectina Pc da alga marinha vermelha 61  
*Pterocladia capillacea*
- TABELA 3-** Efeito antinociceptivo da lectina Pc na ausência e presença 64  
de seu hapteno (mucina), sobre as contorções abdominais  
em camundongos induzidas por ácido acético 0,8%
- TABELA 4-** Efeito antinociceptivo da lectina Pc na ausência e presença 68  
de seu hapteno (mucina), no teste da formalina em  
camundongos
- TABELA 5-** Efeito da lectina Pc no teste da placa quente em 73  
camundongos

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-</b>	Alga marinha vermelha <i>Pterocladia capillacea</i>	39
<b>FIGURA 2-</b>	Esquema de extração e purificação da lectina Pc da alga marinha vermelha <i>P. capillacea</i>	41
<b>FIGURA 3-</b>	Efeito do ácido acético 0,8 % administrado por via intraperitoneal (extensão das patas posteriores) no ensaio das contorções abdominais	46
<b>FIGURA 4-</b>	Efeito da formalina 1 % (lambadura), em camundongos administrada por via intraplantar	48
<b>FIGURA 5-</b>	Pletismômetro utilizado para a medição do edema	52
<b>FIGURA 6-</b>	Cromatografia de troca iônica em gel de DEAE-celulose do extrato total da alga <i>P. capillacea</i> equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5	59
<b>FIGURA 7-</b>	Cromatografia de afinidade em coluna de Goma de Guar do PII da DEAE-celulose	59
<b>FIGURA 8-</b>	Eletroforese <i>Nativa</i> em gel de poliacrilamida 12 %	60
<b>FIGURA 9-</b>	PAGE-SDS da lectina Pc da alga marinha vermelha <i>Pterocladia capillacea</i>	60
<b>FIGURA 10-</b>	Estudo da atividade antinociceptiva da lectina Pc em modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8%	65
<b>FIGURA 11-</b>	Estudo da atividade antinociceptiva da lectina Pc em modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8%	66

<b>FIGURA 12-</b> Efeito da Pc no teste da formalina em camundongos	69
<b>FIGURA 13-</b> Efeito da Pc no teste da formalina em camundongos frente a controles negativo e positivo	70
<b>FIGURA 14-</b> Efeito da Pc sobre a placa quente	74
<b>FIGURA 15-</b> Efeito da Pc sobre a contratilidade duodenal <i>in vitro</i>	76
<b>FIGURA 16-</b> Efeito da Pc sobre a migração de leucócitos induzida por carragenana	79
<b>FIGURA 17-</b> Variação do volume de pata induzido por carragenana	81
<b>FIGURA 18-</b> Dosagem bioquímica de Uréia, Fosfatase Alcalina, TGO e TGP	83
<b>FIGURA 19-</b> Variação do peso dos animais e dos órgão (rim e fígado) ao longo do ensaio para a verificação da toxicidade da Pc	84

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

**ALT-** Alanina aminotransferase

**AMPc-** Adenosina monofosfato

**ANOVA-** Análise de variância

**AST-** Aspartato aminotransferase

**ATP-** Adenosina trifosfato

**BSA-** Albumina Sérica Bovina

**° C-** Grau centígrado

**Cg-** Carragenana

**COX-1-** Cicloxigenase 1

**COX-2-** Cicloxigenase 2

**DEAE-** Dietilaminoetil

**DEXA-** Dexametasona

**EDTA-** Ácido etilenodiaminotetracético

**E.P.M-** Erro padrão da média

**HE-** Hematoxilina-Eosina

**i.v-** intravenosa

**i.p-** intraperitoneal

**i.pl-** intraplantar

**kDa-** Kilodaltons

**min-** minuto

**mg-** miligramas

**mL-** mililitros

**nm-** nanômetros

**Pc-** Lectina da Alga Marinha Vermelha *Pterocladia capillacea*

**PI-** Pico I

**PII-** Pico II

**PGI<sub>2</sub>**- Prostaglandinas da série I

**PGE<sub>2</sub>**- Prostaglandinas da série E

**s-** segundos

**s.c-** subcutânea

**SDS-** Dodecil sulfato de sódio

**SNC-** Sistema Nervoso Central

**TEMED-** N,N,N',N',tetrametiletilenodiamino

**TGO-**Transaminase Glutâmica Oxalacética

**TGP-** Transaminase Glutâmica Pirúvica

**TRIS-** Hidroximetil aminometano

**U.H-** Unidade de hemaglutinação

**μL-** Microlitros

**%-** Percentagem

## RESUMO

Lectinas de algas marinhas têm-se mostrado importantes ferramentas biotecnológicas. Objetivou-se estudar as atividades antinociceptivas e antiinflamatórias da lectina da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea* (Pc). A Pc, apresentando atividade hemaglutinante contra eritrócitos tripsinizados de coelho, foi obtida a partir da aplicação do extrato protéico total em cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose seguida da cromatografia de afinidade em coluna de goma de guar. A seguir, foi utilizada nos ensaios de nocicepção e inflamação, utilizando camundongos machos *Swiss* e ratos machos *Wistar*, respectivamente. Pc (0,9; 8,1 ou 72,9 mg/kg; i.v) foi administrada 30 min antes de cada estímulo nocigênico, ou seja, antes da injeção i.p de ácido acético a 0,8% (10 µL/mL), da injeção intraplantar de formalina a 1% (20 µL/pata) ou do teste da Placa quente (51±1 °C), e comparada a animais não tratados ou pré-tratados com Indometacina ou Morfina, ambas a 5 mg/kg; s.c. Observou-se que a Pc (0,9; 8,1 ou 72,9 mg/kg) reduziu significativamente o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em 29,2%; 39,3%, e 51,9%, respectivamente. Pc (72,9 mg/kg) também reduziu (p<0,05) a fase 1 (neurogênica) e a fase 2 (inflamatória) observadas após administração da formalina, em 58% e 87%, respectivamente. Entretanto, a Pc (72,9 mg/kg) não foi capaz de reduzir a nocicepção observada no teste da Placa Quente, quando comparada à morfina. Os efeitos antinociceptivos da Pc foram abolidos quando a Pc foi pré-incubada com a glicoproteína mucina (1,25 mg/mL), inibidora de sua atividade hemaglutinante. Sugere-se, portanto, que a atividade antinociceptiva da Pc possa ser predominante via inibição de mecanismos periféricos. Assim, seguiram-se os ensaios de indução da migração neutrofílica para cavidade peritoneal ou do edema de pata de ratos por Carragenana (Cg-tipo λ; 500 µg/cavidade ou pata), onde observou-se que a administração da Pc (8,1 mg/kg; i.v) 30 min antes da Cg reduziu significativamente a contagem do número de neutrófilos em 84%. No entanto, a Pc não foi capaz de prevenir o edema de pata induzido pela Cg. Desta forma, sugere-se que esta proteína foi capaz de reduzir o mecanismo de migração de neutrófilos, possivelmente ligando-se à moléculas específicas celulares, como por exemplo, selectinas. Para confirmar sua segurança, a Pc (8,1 mg/kg) foi administrada em camundongos diariamente e no 7º dia foram coletadas amostras sanguíneas para dosagens de uréia e transaminases (TGO e TGP), e pesados rins e fígado. Observou-se que a Pc não causou alterações significativas, sugerindo portanto, ser segura no período de administração avaliado. Dessa forma, considerando os dados em conjunto, conclui-se que a Pc possui propriedades antinociceptiva e antiinflamatória com ação periférica.

Palavras-chave: Lectina; Alga marinha; Antinocicepção; Inflamação.

## ABSTRACT

Marine algae lectins had been showing important biotechnical tools. Our objectives were to study the antinociceptive and anti-inflammatory activities of the lectin from the marine red alga *Pterocladia capillacea* (Pc). The Pc, presenting haemagglutinating activity against trypsin-treated erythrocytes from rabbit, was purified by application of crude extract (0.025 M Tris-HCl buffer, pH 7.5) on ion exchange chromatography on DEAE-cellulose followed by affinity chromatography on guar-gum column. To proceed, it was used in the nociception and inflammation assays, using male *Swiss* mice and male *Wistar* rats, respectively. Pc (0.9; 8.1 or 72.9 mg/kg; i.v) it was administered 30 min before each challenge, that is, before the injection i.p of acetic acid 0.8% (10  $\mu$ l/mL), of the intraplantar injection of 1% formalin (20  $\mu$ L/paw) or of the Hot Plate test ( $52\pm 1$  °C), and compared to non treated animals or to pre-treated by Indomethacin or Morphine, both at 5 mg/kg; s.c. It was observed that the Pc (0.9; 8.1 or 72.9 mg/kg) reduced significantly the number of writhes induced by acetic acid (29.2%; 39.3%, and 51.9%, respectively). Pc (72.9 mg/kg) also reduced ( $p<0.05$ ) the 1<sup>st</sup> phase (neurogenic) and the 2<sup>nd</sup> phase (inflammatory) observed after administration of the formalin (58% and 87%, respectively). However, the Pc (72.9 mg/kg) was not capable to reduce the nociception evaluated by Hot Plate test, compared to morphine. These antinociceptive effects were abolished when the Pc was pre-incubated with mucin (1.25 mg/mL), inhibitory glycoprotein of its haemagglutinating activity. Therefore, it is suggested that the antinociceptive activity of the Pc can be predominant by inhibition of peripheral mechanisms. After this, was realized the assays of neutrophil migration for peritoneal cavity or of the paw edema of mice by Carragenan (Cg-type  $\lambda$ ; 500 g/cavity or paw), where was observed that the administration of the Pc (8,1 mg/kg) 30 min before Cg reduced the neutrophil counts significantly by 84%. However, Pc was not capable to prevent the paw edema induced by Cg. This way, it is suggested that this protein was capable to reduce neutrophil migration by previous mechanism to migration, possibly linking to cellular specific molecules as, for example, selectins. Then, to confirm its safety, the Pc (8.1 mg/kg) was administered daily in mice and observed their behaviors, and at the 7<sup>th</sup> day, sanguine samples were collected for urea and transaminases (TGO and TGP) dosages, and heavy kidneys and liver. It was observed that Pc did not cause significant alterations, suggesting be safety for the administration period. Considering the data together, it is ended that the Pc possesses antinociceptive and anti-inflammatory properties with peripheral action.

Key words: Lectin; Marine algae; Antinociception; Inflammation.



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Algas Marinhas

As algas marinhas pertencem ao reino protista, que engloba uma ampla variedade de organismos, incluindo formas unicelulares, coloniais e multicelulares simples. Os organismos pertencentes a este reino são eucarióticos, não estando incluídos no reino dos fungos, das plantas ou dos animais. Elas são organismos fotossintetizantes, sendo importantes componentes da cadeia alimentar aquática estando divididas em três filós: Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas pardas) e Chlorophyta (algas verdes) (RAVEN et al., 2001).

As algas pertencentes ao filo Rhodophyta geralmente crescem fixas a substrato, e algumas crescem em grandes profundidades, onde seus cloroplastos contêm predominantemente ficobilinas que mascaram a cor da clorofila **a** dando a estas algas sua cor característica. Elas são fonte de carboidratos úteis e valiosos, tais com o ágar e a carragenana. As algas pardas incluem as maiores e mais complexas algas marinhas, sendo mais conspícuas em águas temperadas, boreais e pobres. Além das clorofilas **a** e **c**, os cloroplastos também contêm vários carotenóides, incluindo uma grande quantidade de fucoxantina. As algas verdes incluem uma grande diversidade de formas de água doce e terrestre, além das marinhas. Dentro da classe Ulvophyceae (Ulvofíceas), seus componentes são principalmente marinhos. Várias classes de algas verdes têm sido definidas baseando-se na divisão celular, estrutura da célula reprodutiva, dentre outras características (RAVEN et al., 2001).

Além de sua importância ecológica, as algas são consideradas excelentes fontes de proteínas e carboidratos, possuindo baixos teores de lipídios (MABEAU et al., 1992).

A aplicação de compostos químicos isolados das diversas espécies de algas têm revelado importantes resultados nas mais variadas aplicações

biológica (CARDOZO et al., 2007). Dentre estes compostos, destacam-se: os polissacarídeos sulfatados e lectinas que têm sido utilizados em pesquisas biomédicas e proporcionado bons resultados (SMIT, 2004).

## 1.2 Lectinas

As lectinas foram primeiramente descritas por Stillmark (1888), onde ele estudou e isolou uma lectina tóxica obtida de sementes de mamona (*Ricinus communis*), a qual foi denominada de ricina (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). A partir de então, um número considerável destas proteínas têm sido isoladas e caracterizadas, sendo encontradas em todas as classes de organismos vivos (vertebrados, invertebrados, algas e microorganismos), mas não necessariamente em todos os gêneros e espécies (LIS & SHARON, 1981).

Inicialmente as lectinas foram denominadas de fitohemaglutininas, por terem sido encontradas em extratos vegetais e aglutinarem hemácias. No entanto, o termo foi substituído por Boyd e Shapleigh (1954), onde passou a ser denominado de lectina, que no latim denomina-se *Legere*, escolher. Os mesmos observaram que essas proteínas aglutinavam seletivamente eritrócitos humanos. Posteriormente, outras definições ampliaram o conceito de lectinas destacando sua especificidade por carboidratos.

Através de estudos relacionados à análise estrutural e funcional de lectinas, foi possível obter novas definições para essa classe de proteínas. Atualmente, a mais aceita é a de PEUMANS & VAN DAMME (1995), os quais as definiram como proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de ligar-se reversivelmente a mono- ou oligossacarídeos específicos. Esta definição permite incluir uma ampla gama de proteínas, com diferentes propriedades de aglutinação e/ou precipitação de glicoconjugados. Desta forma, tendo por base essa definição, as lectinas podem ser subdivididas em três grupos. O primeiro grupo compreende as Merolectinas que inclui lectinas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidratos e, conseqüentemente, não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados; Hololectinas que possuem dois ou mais domínios de ligação á

carboidratos que podem ser iguais ou homólogos, sendo constituídas por domínios ligantes a carboidratos, não possuindo qualquer outra atividade, compreendendo todas as lectinas com múltiplos sítios de ligação que são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. Outro grupo corresponde às Quimerolectinas, proteínas que além do domínio ligante á carboidratos, possuem outro domínio, apresentando uma atividade catalítica (ou outra atividade biológica), mas que atuam independente dos domínios ligantes a carboidratos. Por fim, compreendendo o quarto grupo, as Superlectinas que constituem um tipo especial de quimerolectinas, contendo no mínimo, dois domínios ligantes a carboidratos, os quais são estruturalmente distintos e reconhecem carboidratos diferentes.

No entanto, estas proteínas ligantes de carboidratos medeiam o reconhecimento celular e servem como ferramentas no estudo de glicoconjugados. Essa característica de ligação a carboidratos específicos permite que tais biomoléculas possam ser utilizadas para tipar grupos sanguíneos e como marcadores celulares com o propósito de diagnosticar agentes infecciosos (vírus, bactérias, fungos e parasitas) (RUDIGER; GABIUS, 2001). Essas proteínas podem ainda, ser utilizadas como agentes terapêuticos alvo para diferenciar partes do intestino ou até diferenciar células devido a propriedade de aumentar a aderência do epitélio intestinal e intensificar a penetração de drogas (CHOWDARY; RAO, 2004). Além disso, as lectinas podem ser utilizadas como bioadesivos que se ligam á superfície da mucosa, dentre outras utilidades farmacêuticas (JEPSON et al., 2004).

Desta forma, a interação específica de lectinas com glicoconjugados em solução ou superfície celular faz dessas moléculas ferramentas valiosas nas ciências biomédicas e biotecnológicas, podendo ser utilizadas em aplicações biológicas (VAN DRIESSCHE et al., 1996). Assim, diante de sua especificidade a carboidratos elas podem ser determinadas com uso de ensaios de inibição por haptenos. Esta propriedade tem se mostrado como eficiente ferramenta de purificação dessas moléculas empregando-se cromatografias de afinidade.

Lectinas são ainda reconhecidas por contribuírem de forma dinâmica no reconhecimento de células tumorais, localização e adesão celular, estimulação mitogênica, citotoxicidade e apoptose (WANG et al., 2000).

### 1.2.1 Lectinas de Algas Marinhas

Muitas lectinas de algas marinhas apresentam propriedades diferentes de outras lectinas (ROGERS & FISH, 1991). Tais lectinas geralmente apresentam massas moleculares mais baixas que as de vegetais superiores; não apresentam afinidade por açúcares simples, mas por oligossacarídeos complexos, e não requerem cátions divalentes para a sua atividade biológica (ROGERS et al., 1993), características essas, que as tornam de muito interesse.

O primeiro estudo da presença de lectinas em algas marinhas utilizando eritrócitos humanos foi relatado por BOYD *et al.*, 1966. Dentre os 24 extratos aquosos utilizados, seis algas pardas aglutinaram eritrócitos dos grupo A e B, uma verde e duas pardas aglutinaram inespecificamente eritrócitos de todos os grupos, enquanto uma alga vermelha apresentou especificidade por eritrócitos humanos do grupo A.

BLUNDEN & ROGERS (1975) observaram a presença de atividade hemaglutinante contra suspensão de eritrócitos humanos a 2% dos grupos sanguíneos A, B e O em extratos salinos de 19 espécies de algas marinhas pertencentes às classes Chlorophyceae, Phaeophyceae e Rhodophyceae coletadas na costa da Inglaterra.

No Brasil, os estudos com lectinas de algas marinhas tiveram início com AINOUZ & SAMPAIO (1991) que detectaram a presença dessas hemaglutininas nas algas marinhas da costa cearense. Das algas estudadas cerca de 65% das espécies utilizadas eram capazes de aglutinar pelo menos um tipo de eritrócito testado. Dentre os eritrócitos tripsinizados utilizados (carneiro, coelho, galinha, cabra, boi e do sistema ABO), os de coelho e galinha

foram os mais susceptíveis à aglutinação, enquanto que os eritrócitos de cabra não apresentaram resultados positivos.

Dando continuidade com o estudo de lectinas de algas marinhas, FREITAS et al., 1997, estudaram a ocorrência de hemaglutininas em extratos de 30 espécies do litoral cearense utilizando eritrócitos nativos de coelho, galinha, carneiro e humanos do sistema ABO e tratados enzimaticamente. Posteriormente, BENEVIDES et al., 1999, estudando a variação sazonal através da atividade hemaglutinante em duas espécies de algas marinhas (*Gracilaria domingensis* e *Gelidium pusillum*), verificaram uma variação na presença da atividade hemaglutinante de acordo com o período do ano, sugerindo assim cautela durante os trabalhos de levantamento da atividade hemaglutinante em algas marinhas.

Sabe-se que em vegetais superiores, as lectinas estão envolvidas na defesa contra bactérias e fungos patogênicos pelo reconhecimento e imobilização de microorganismos via ligação, prevenindo o crescimento e a multiplicação (LIAO et al., 2003). Entretanto, apesar do conhecimento de que possuem atividade antiviral, antifúngica, antibacteriana, hemolítica e tóxica, pouco se sabe sobre o envolvimento de lectinas de algas nas funções fisiológicas (VIANA et al., 2002).

### 1.3 Isolamento e Purificação de Lectinas de Algas Marinhas

O processo de purificação e caracterização das lectinas de algas marinhas passa por uma série de etapas que tem início com a extração das proteínas solúveis do material biológico em soluções salinas tamponantes. Em seguida, os extratos protéicos podem sofrer precipitações salinas ou serem diretamente empregados em colunas cromatográficas, tais como as de troca iônica, de afinidade ou de filtração em gel.

Atualmente várias etapas de isolamento de lectinas utilizando precipitação protéica com sulfato de amônio seguida de cromatografias de

troca iônica estão sendo substituídas pela aplicação direta do material protéico total em coluna de afinidade, devido a praticidade e segurança do material obtido além de bons resultados de rendimento e purificação. Neste tipo de cromatografia, a coluna apresenta como ligante o açúcar, ao qual a lectina tem afinidade. Como exemplo, pode ser destacado a lectina isolada da alga marinha *Gracilaria ornata* (LEITE et al., 2005), que mostrou afinidade pela glicoproteína mucina e esta por sua vez, foi acoplada a uma matriz para a purificação da proteína. A glicoproteína mucina pode ser obtida a partir do estômago de porco, sendo composta por ácido hexurônico, apresentando em sua estrutura prolina, treonina. Geralmente é solúvel em tampões aquosos com altas concentrações de inibidores de proteases (FORSTNER & FORSTNER, 1994).

Outra glicoproteína de muito interesse e utilizada em ensaios de inibição da atividade hemaglutinante é a manana, a qual foi capaz de inibir a atividade hemaglutinante da lectina presente na alga marinha *Solieria filiformes* (BENEVIDES et al., 1996), e assim, utilizada na purificação da própria proteína. Esta glicoproteína é composta por polímeros de manose, podendo ser obtida da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A lectina da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea* foi purificada por OLIVEIRA et al., 2002, não sendo considerada uma glicoproteína, e portanto, não necessitando de cátions divalentes para exercer sua atividade hemaglutinante. Esta lectina mostrou-se específica para eritrócitos de coelho, tratados com tripsina, bromelaína ou subtilisina, e especificidade pela glicoproteína mucina de estômago de porco. A massa molecular aparente por filtração em gel foi de 5,8 kDa e pelo processo eletroforético em presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol apresentou uma única banda, indicando que a lectina é uma proteína monomérica. Sua energia de ativação do processo de desnaturação ( $\Delta G^\ddagger$ ) foi calculada em 106,87 kJ. Mol<sup>-1</sup> a 70 °C, apresentando a perda total da atividade hemaglutinante a 80 °C por 10 minutos.

#### 1.4 Aplicações e Atividades Biológicas de Lectinas de Algas Marinhas

As algas marinhas têm sido consideradas fonte de compostos bioativos com potencial nas áreas biológicas e farmacológicas e, portanto, despertado o interesse em sua utilização pelo grande potencial de aplicação.

Pouco se sabe sobre o mecanismo das atividades biológicas e farmacológicas das lectinas, mas se sabe que envolve a participação de resíduos de carboidratos presentes nas estruturas com as quais elas interagem. Desta forma, a presença de açúcares na superfície das células serve como sítios de ligação potenciais para as lectinas (SHARON & LIS, 1989).

Muitas proteínas e lipídios da superfície de membranas celulares são glicosilados e estes glicanos são sítios de ligação para lectinas. A combinação de um pequeno número de açúcares pode produzir uma gama de estruturas químicas diferentes. Desta forma, diferentes tipos de células, expressam diferentes glicanos e em particular, células doentes, tal como as transformadas ou células cancerosas, que expressam diferentes glicanos quando comparadas com células normais. Portanto, lectinas podem ser utilizadas para direcionar drogas a alvos específicos, sendo capazes de diferenciar células e tecidos (BIES et al., 2004).

Segundo NELSON & COX, 2002, as lectinas são empregadas em uma variedade de processos de reconhecimento célula-célula e processos de adesão celular. Em laboratório, lectinas purificadas, podem ser utilizadas como reagentes para detecção e separação de glicoproteínas com composições oligossacarídicas diferentes.

No que diz respeito à aplicação biológica de lectinas de algas marinhas, alguns estudos mostraram que essas proteínas podem ser utilizadas no reconhecimento de células malignas, como agentes mitogênicos, como imunossupressor e na tipagem sanguínea (ROGERS et al., 1986; DALTON et al., 1995).

Algumas espécies de algas marinhas produzem substâncias antibióticas capazes de inibir bactérias, vírus e fungos. Como exemplo, destaca-se o extrato protéico de *P. capillacea* que foi capaz de inibir o crescimento de *Vibrio vulnificus* revelando formação de zonas de inibição na superfície do ágar. Desta forma, a atividade antibiótica de lectinas sobre esta bactéria patogênica de peixe, revelou um importante papel de lectinas de algas, bem como um alto potencial econômico destes vegetais inferiores para a aquacultura e biomedicina (LIAO et al., 2003).

A lectina presente na alga marinha vermelha *Solieria filiformes*, isolada por BENEVIDES et al., 1996, mostrou efeito sobre o crescimento de eubactérias patogênicas (HOLANDA et al., 2005), bem como sobre o desenvolvimento de carrapatos bovinos (NASCIMENTO, 2003). Outra lectina que também foi avaliada quanto aos seus efeitos sobre o desenvolvimento de carrapatos bovinos, foi obtida da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* (LIMA et al., 2005). Esta proteína foi capaz de reduzir a massa das fêmeas de carrapatos após o período de oviposição, o peso dos ovos e o tempo de sobrevivência das larvas.

Lectinas isoladas das algas marinha vermelha *Amansia multifida*, *Bryothamnion seaforthii*, *Brythamnion triquetrum* e *Gracilaria caudata*, específicas para oligossacarídeos complexos presentes em glicoproteínas, foram estudadas quanto aos seus efeitos sobre a indução de migração de neutrófilos quando administradas na cavidade peritoneal e em bolha de ar induzida no dorso de ratos ou camundongos. Os resultados obtidos demonstraram que as referidas lectinas foram capazes de induzir, *in vivo* e *in vitro* e, de maneira dose dependente a migração de neutrófilos (NEVES et al., 2001).

A lectina da alga marinha a *A. multifida*, também foi avaliada quanto a sua ação antinociceptiva em camundongos (NEVES et al., 2007) ao ser aplicada nos ensaios de contagem do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina mensurado através do tempo de lambadura da pata pelo animal após administração de formalina 1% e teste da placa quente. Neste estudo, os autores constataram que a lectina foi



capaz de inibir o número das contorções abdominais; reduzir o tempo de lambedura da pata (teste da placa quente), cujo efeito foi revertido por naloxona indicando o envolvimento do sistema opióide. Estes resultados levaram os autores a sugerir que a lectina da alga *A. multifida* apresenta efeito antinociceptivo de ação central e periférica.

Assim, o papel biológico e farmacológico das lectinas de algas marinhas faz parte de uma área de estudos ainda pouco explorada, onde muito conhecimento deverá ser investido para se entender a verdadeira função dessas moléculas.

## 1.5 Dor e Nocicepção

A dor é uma experiência subjetiva difícil de definir, podendo ser uma resposta direta a um evento desfavorável, associado a danos teciduais, como lesão, inflamação ou câncer, ou, surgir de modo independente. Assim, a transmissão da dor ocorre através de um mecanismo que envolve uma interação muito complexa de estruturas periféricas e centrais da superfície da pele ao córtex cerebral central (FRÜST, 1999).

Os nervos periféricos têm terminações sensoriais nos tecidos periféricos do corpo e são ativados por estímulos de vários tipos (mecânicos, térmicos e químicos). Essas terminações são distinguidos de outros tipos de receptores mecânicos ou térmicos pelo seu limiar mais alto, pois são somente ativadas por estímulos de intensidade nóxica suficiente para causar algum grau de lesão tecidual. Esta lesão é a causa imediata da dor e isto resulta na liberação local de uma gama de agentes químicos que se supõe atuarem sobre as terminações nervosas, ativando-as diretamente ou aumentando a sua sensibilidade a outras formas de estímulos (RANG et al., 2007).

A dor inflamatória, portanto, corresponde à liberação de mediadores químicos por células não neuronais no local de injúria. Dependendo do tipo de mediador, este poderá apenas sensibilizar o nociceptor, isto é, diminuir o limiar

de ativação da nocicepção, ativá-lo, ou ainda, ambas as funções. A diminuição do limiar de ativação do nociceptor é denominada de hiperalgesia. Assim, nocicepção é definida como o mecanismo pelo qual os estímulos nódicos periféricos são transmitidos ao sistema nervoso central, enquanto que a dor é uma experiência subjetiva, nem sempre associada com a nocicepção (GRUBB, 1998, FRÜST, 1999).

A partir da medula, o estímulo doloroso ainda prossegue via trato espinotalâmico para estruturas como tálamo e córtex cerebral (KUMMER & COELHO, 2002). Desta forma, nos mecanismos de nocicepção destacam-se os nociceptores polimodais (PMN), que são definidos como os principais tipos de neurônios sensoriais periféricos que respondem aos estímulos nódicos. Esses nociceptores enviam sinais via fibras nervosas aparentes A e  $\delta$ , para o corno posterior da medula, onde fazem sinapses principalmente com neurônios das lâminas I, II e V, e como conseqüência, geram a “sensibilização central da dor”.

Evidências têm demonstrado o envolvimento de diferentes nos fenômenos nociceptivos, incluindo efeitos analgésicos produzidos pelos opióides. Os opióides modificam a excitabilidade membranar e a sinalização intracelular por modificação direta ou indireta do fluxo transmembrana de íons cálcio. Estes íons são importantes na regulação de sistemas endógenos, onde um aumento em sua concentração representa a chave para a realização de neurotransmissão e a modulação da excitabilidade de membranas celulares. Desta forma, antagonistas dos canais de cálcio têm sido usados para o estudo desse íons na nocicepção (PRADO, 2001).

### 1.5.1 Atividade Antinociceptiva

O controle da dor é um dos usos mais importantes a qual se destinam vários fármacos, onde os considerados analgésicos pertencem a quatro categorias principais: agentes semelhantes à morfina (opióides), fármacos

antiinflamatórias não esteróides, anestésicos e várias substâncias não opióides. A antinocicepção induzida por morfina é mediada via ativação dos receptores opióides de membrana e, portanto, podem ser inibidos por antagonistas dos receptores opióides, com a naloxona (BENYHE, 1994). Assim, esta última substância é freqüentemente utilizada como padrão para determinar se a analgesia é mediada por um mecanismo opióide (PICOLO et al., 2000).

As substâncias semelhantes a morfina produzem analgesia através da ação predominante no sistema nervoso central, enquanto os agentes semelhantes à aspirina e aos anestésicos locais, atuam predominantemente a nível periférico.

A morfina é um opióide hidrofílico que promove analgesia intensa e de longa duração, sem provocar bloqueio simpático ou motor. Por outro lado, a morfina ocasiona alguns efeitos indesejáveis, como: euforia, náuseas, vômitos, depressão respiratória, dependência física e psicológica, redução da motilidade gastrointestinal e espasmo do músculo liso, levando a constipação e algumas vezes espasmo biliar e uretral (SILVA et al., 2004). Assim, derivados opióides são indicados no tratamento de dores agudas, moderadas ou intensas, que não respondem a analgésicos menos potentes ou que, por sua natureza, não são a eles suscetíveis. Também são eficazes no controle da dor crônica, sendo a tolerância e a dependência física fatores limitantes do seu uso prolongado (FUCHUS & WANNAMACHER, 1998).

Desta forma, testes com fármacos analgésicos utilizando animais, permitem avaliar a nocicepção, determinando as reações dos mesmos a um estímulo doloroso, com freqüência mecânica ou térmica.

### 1.5.2 Ensaio Antinociceptivos

Dentre os testes utilizados para verificar a ação antinociceptiva utilizando camundongos, destaca-se o teste das contorções abdominais. Neste ensaio, as contorções abdominais (nocicepção periférica) são induzidas por ácido

acético (estimulação química) e as substâncias utilizadas como controle da dor central e periférica, são: morfina e indometacina, respectivamente.

O modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético é útil para revelar o efeito antinociceptivo de substâncias, mostrando a participação de mediadores da via endógena, tais como bradicininas, serotoninas e capsaicinas, os quais estimulam os neurônios nociceptivos periféricos (MARCHIORO et al., 2005). Neste modelo, ocorre a estimulação direta dos receptores químicos no peritônio, onde a administração (via i.p) de ácido acético aumenta localmente os níveis de prostaglandinas (SANTOS et al., 1998). Trata-se de um modelo muito sensível para o estudo de analgésicos não-hormonais (TITA et al., 2001).

Como complemento do estudo, outros ensaios clássicos de nocicepção também são comumente utilizados. Assim, o teste da “formalina” é útil para se compor o entendimento das vias antinociceptivas associadas.

No teste da formalina, a injeção (i.p) de formol a 1% (formalina) em camundongos, produz resposta bifásica distinta. A primeira fase representa o efeito irritante da formalina nas fibras sensoriais do tipo C, o que caracteriza a dor neurogênica, onde há liberação de alguns neurotransmissores como a substância P. A segunda fase é caracterizada pela dor inflamatória, ocorrendo liberação de vários mediadores inflamatórios, como a serotonina, histamina, bradicinina, e prostaglandinas.

## 1.6 Inflamação

A inflamação age no sentido de remover ou inibir o agente causador, desencadeando uma série de eventos que promovem o retorno do organismo à condição normal, incluindo a reconstrução do tecido lesado (ROBBINS et al., 1994). Ao ocorrer uma lesão tecidual ocasionada por bactérias, traumatismo, substâncias químicas, calor ou qualquer outro fenômeno, os tecidos lesados liberam múltiplas substâncias que provocam alterações nos tecidos. Assim,

todo o complexo das alterações teciduais observadas é denominado de inflamação. Esta por sua vez, pode levar a danos teciduais e até mesmo decomposição fisiológica, disfunção e morte dos órgãos, estando dividida em duas categorias principais: aguda e crônica, diferindo na duração e no aspecto patológico (GUYTON & HALL, 2002).

A inflamação pode ser caracterizada por: vasodilatação dos vasos sangüíneos locais, aumento da permeabilidade dos capilares locais, coagulação dos líquidos nos espaços intersticiais, migração de inúmeros granulócitos e monócitos para o tecido e edema das células. A reação inflamatória consiste num evento complexo que envolve o reconhecimento do agente/estímulo lesivo, para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado. O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória (NATHAN, 2002). Assim, dos inúmeros produtos teciduais que causam essas reações incluem histamina, bradicinina, serotonina, prostaglandinas, produtos de reação do sistema da coagulação sangüínea e múltiplas substâncias denominadas linfocinas, que são liberadas pelos linfócitos T sensibilizados (WAGNER & ROTH, 2000).

O processo inflamatório ocorre em dois momentos, sendo o primeiro desencadeado logo após a infecção (inflamação aguda), de curta duração, podendo variar de algumas horas até poucos dias entre o início, o desenvolvimento e o término. Essa fase é caracterizada por apresentar infiltrado predominantemente neutrofílico no sítio da inflamação, extravasamento de material protéico e plasma, aumento da permeabilidade vascular e eventos sistêmicos tais como aumento da temperatura, dor e elevação do conteúdo plasmático de várias proteínas (BAUHMANN & GAUDIE, 1994).

O segundo momento depende ou não da resolução do processo na fase aguda (inflamação crônica), caracterizado pela presença de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese e proliferação de tecido conjuntivo. A inflamação crônica é considerada um processo prolongado que pode ter semanas ou até anos de duração (BAUHMANN & GAUDIE, 1994).

### 1.6.1 Células Envolvidas na Inflamação

Dentre as células envolvidas na inflamação, algumas estão presentes nos tecidos como as células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos, enquanto plaquetas e leucócitos têm acesso à área de inflamação a partir do sangue. Os leucócitos são células ativamente móveis que podem ser divididas em duas classes: células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos) (BEVILACQUA et al., 1994)

Os neutrófilos possuem atividade microbicida e fagocitária nos locais de inflamação. São os leucócitos predominantes na circulação, mas possuem vida curta, sendo produzidos na medula óssea e considerados os principais elementos celulares em muitas formas de inflamação aguda principalmente durante o estágio inicial da resposta inflamatória e suas funções são: manutenção da defesa normal do hospedeiro contra microorganismos invasores, remover restos teciduais e agir nos meios extra e intracelular para matar e degradar microorganismos através de enzimas digestivas presentes nos seus grânulos citoplasmáticos. Podem ainda funcionar como descarregador do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos nos vacúolos fagocitários, além de reconhecer, aderir e englobar partículas (fagocitose) (HAMPTON et al., 1998).

Encontrados nos tecidos doentes, os eosinófilos predominam em duas formas de inflamação: alergia e infecções parasitárias. Pertencem a série granulocítica e têm período de vida relativamente curto apresentando núcleo bilobado e sem nucléolo. Seus grânulos citoplasmáticos distinguem-se por apresentarem alto conteúdo de uma peroxidase bioquimicamente distinta e pela presença de pelo menos três outras proteínas básicas.

Os basófilos por sua vez, estão localizados imediatamente na parte externa de muitos dos capilares do organismo e diferentemente dos demais granulócitos, não são encontrados no tecido conjuntivo e são as menores células granulocíticas, possuindo um núcleo volumoso, bilobado ou multilobado, cromatina nuclear periféricamente condensada em grânulos

citoplasmáticos menores do que os outros granulócitos. Constituem menos de 1% dos leucócitos do sangue, sendo difíceis de ser encontrados nos esfregaços de sangue, apresentando a função de secretar mediadores inflamatórios que aumentam a permeabilidade vascular e fatores quimiotáticos que recrutam outras células inflamatórias (RANG et al., 2007).

Consideradas células fagocíticas, os macrófagos desempenham o papel de células secretoras e regulatórias de processos imunes e inflamatórios. Possuem a capacidade de secretar um amplo número de substâncias que incluem enzimas, inibidores enzimáticos, proteínas do sistema complemento, dentre outros. Quando ativados, sofrem modificações morfológicas, metabólicas e funcionais, como: aumento de tamanho, alteração da membrana plasmática, maior formação de pseudópodos, aumento no número de vesículas pinocíticas, maior metabolismo de glicose, migração mais vigorosa, maior capacidade de matar microorganismos intracelulares facultativos e células tumorais (STITES & TERR., 1992).

Os mastócitos por sua vez, caracterizam-se por serem células globulosas, grandes, com o citoplasma carregado de grânulos que contém mediadores químicos da inflamação como a heparina, histamina, serotonina e fator quimiotático para neutrófilos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Eles estão localizados em órgãos como a pele, pulmões, vias gastrintestinais e mucosas nasais e estão estrategicamente posicionados para interagir com antígenos ingeridos ou inalados e secretar seu potente esquadrão de mediadores inflamatórios. São células do tecido conjuntivo e sua principal função é produzir e armazenar mediadores químicos no processo inflamatório, onde seu núcleo é esférico e central, onde os grânulos citoplasmáticos são eletrodensos e ligados a membrana. Durante a ativação dos mastócitos mediada por IgE, a estrutura cristalina dos grânulos citoplasmáticos de mastócitos humanos da pele e dos pulmões é perdida e isso ocorre devido a uma série de eventos que incluem o alargamento dos grânulos citoplasmáticos, solubilização granular e fusão de membrana de grânulos citoplasmáticos adjacentes com a membrana da superfície da célula (STITES & TERR., 1992). Seu papel como células residentes nos tecidos foi observada no modelo de

contorções abdominais, onde após a diminuição da população de mastócitos da cavidade intraperitoneal por lavagem prévia, ocorreu redução da atividade nociceptiva do ácido acético ou do zymosan (RIBEIRO et al., 2000).

#### 1.6.2 Mediadores Químicos da Inflamação

Os mediadores podem estar presentes no plasma em formas precursoras que devem ser ativadas, ou podem estar presentes em células dentro de grânulos, como por exemplo, a histamina nos grânulos de mastócitos. Podem, também, ser sintetizados originalmente, tais como as prostaglandinas, em resposta a um estímulo adverso. Alguns mediadores exibem atividade enzimática direta, como as proteases lisossômicas, ou medeiam uma lesão oxidativa, a exemplo dos metabólitos do oxigênio. Contudo, a maioria dos mediadores realizam atividade ligando-se a receptores específicos em células alvo.

Um mediador químico pode estimular a liberação de mediadores pelas próprias células-alvo, constituindo mecanismos por amplificação ou neutralização dos mediadores iniciais. Eles podem atuar em um ou vários tipos celulares, possuir alvos difusos, ou ainda, apresentar efeitos diversos, de acordo com os tipos de células e tecidos. Os mediadores da dor inflamatória compreendem, portanto, os que causam sensibilização do nociceptor (hiperalgésicos) e os que ativam diretamente o nociceptor (COTRAN et al., 2000).

A hiperalgesia pode ser classificada como imediata, tardia ou persistente, dependendo da duração do platô. A hiperalgesia imediata pode ser alcançada com a injeção de prostaciclina ( $PGI_2$ ) que atinge um pico após 30 minutos e não obtêm platô. A hiperalgesia tardia pode ocorrer após indução por aminas simpatomiméticas a  $PGI_2$  atinge um pico 2 a 3 horas após o estímulo, seguida de um platô de 2 horas. A hiperalgesia persistente ocorre com períodos freqüentes de sensibilização do receptor induzida por  $PGE_2$  ou dopamina (FERREIRA et al., 1990).



Há evidências de que a concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e do íon cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) estejam associados com a sensibilização dos nociceptores. Foi demonstrado que o dibutiryl AMPc (análogo membrana permeável do AMPc), quando em altas doses, causava hiperalgesia (BRITO et al., 2001). Prostaglandinas e aminas simpatomiméticas também causam hiperalgesia por estimular a síntese de AMPc. Por outro lado, inibidores da COX e bloqueadores adrenérgicos são capazes de inibir a hiperalgesia induzida por prostaglandinas e aminas simpatomiméticas respectivamente (NAKAMURA & FERREIRA, 1987). As prostaglandinas são sintetizadas a partir de ácido araquidônico pela enzima cicloxigenase, a qual se apresenta sobre uma forma induzida (COX-2) e, uma forma constitutiva (COX-1). A primeira é indetectável nos tecidos em condições fisiológicas, mas aumenta sua expressão em até 80 vezes durante inflamação ou estímulo mitogênico. A segunda apresenta-se em processos fisiológicos normais e é responsável pela síntese de prostaglandinas (FAMAHEY, 1997).

A bradicinina é um mediador capaz de ativar diretamente o receptor, mas também causa um efeito hiperalgésico demorado. Este efeito hiperalgésico ocorre devido a liberação de prostanóides induzidos pela bradicinina, pois quando é administrada indometacina (inibidor da COX) o efeito hiperalgésico é inibido (TAIWO & LEVINE, 1988; STERANKA et al., 1988).

A histamina é um mediador pré-formado presente nos mastócitos com um papel central nas reações de hipersensibilidade imediata. Este mediador também atua na dor inflamatória por ativação direta do nociceptor. Outros mediadores, como a substância P, a serotonina e a adenosina trifosfato (ATP) também participam da ativação direta do nociceptor (HARDMAN et al., 1996).

As citocinas são proteínas de massa molecular menor ou igual a 80 kDa, sendo produzidas e secretadas por tipos celulares diversos (linfócitos, macrófagos ativados, células do endotélio, epitélio e tecido conjuntivo) que modulam a função de outras células. As interleucinas são citocinas produzidas por células hematopóéticas e atuam primariamente sobre leucócitos. As quimiocinas são citocinas que estimulam o movimento leucocitário

(quimiocinese) e o movimento dirigido (quimiotaxia) (COTRAN et al., 2000). Elas induzem o rolamento e adesão de neutrófilos pela transmigração pelo espaço extravascular, onde esses dois fenômenos envolvem a participação de diferentes famílias de moléculas de adesão, incluindo selectinas, integrinas e imunoglobulinas (PANES et al., 1999).

### 1.7 Importância dos Vegetais como Fornecedores de Compostos com Ação Farmacológica

Por muito tempo, a humanidade tem se beneficiado de substâncias extraídas a partir de vegetais, animais, minerais ou provindas de microorganismos (KAYSER et al., 2003). Com isso, a busca incansável de substâncias eficazes no controle da dor e inflamação, com mínimos efeitos colaterais, tem despertado em muitos pesquisadores o interesse por vegetais como uma importante fonte desses compostos.

Desta forma, a importância de compostos ativos derivados de plantas no desenvolvimento de fármacos pode ser comprovada a partir de fármacos como a morfina, quinina, dicumarol, digitoxina, atropina e outros. Isto tudo, sem mencionar que a descoberta da atividade de algumas substâncias também tem possibilitado novas possibilidades de intervenções terapêuticas. São exemplos, a cocaína que originou os anestésicos locais e a conseqüente prática da anestesia local, e a atropina que introduziu os anticolinérgicos.

Os produtos naturais podem exercer seus efeitos analgésicos ao atuarem por mecanismos de ação diversos em fenômenos dolorosos relacionados com os processos inflamatórios. Geralmente, a dor inflamatória está associada à presença de mediadores químicos liberados por células não neuronais no local da injúria. Tais mediadores podem ser, então, classificados em dois tipos: aqueles que causam a sensibilização do nociceptor (hiperalgésicos) e os que causam a sua ativação direta, provocando a dor

declarada em humanos ou o comportamento característico de animais experimentais (DUARTE et al., 1992).

Em adição, fitoterápico é um medicamento obtido a partir de matérias-primas ativas de vegetais, com finalidade profilática e curativa ou para fins de diagnóstico (DI STASI, 1996). No Brasil, várias empresas nacionais, têm usado fitoterápico como suporte (FARIAS et al., 1994). Estima-se que 20% da população consome o equivalente a 63% dos medicamentos disponíveis, enquanto a outra parcela da população encontra nas plantas medicinais o seu tratamento (DI STASI, 1996). Assim, é interessante buscar novas alternativas terapêuticas, menos onerosas e mais acessíveis à população. Nesse sentido, tem-se dado grande ênfase ao estudo de substâncias naturais as quais possam potencialmente apresentar atividade terapêutica, e claramente venham representar uma alternativa eficaz, segura e menos onerosa à população.

Assim, não somente nas plantas superiores espera-se encontrar substâncias de grande interesse terapêutico, mas também nas algas marinhas, consideradas protistas de grande importância ecológica e econômica.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Necessidade da obtenção de um novo composto de origem natural, efetivo no controle da dor e inflamação que apresente poucos efeitos colaterais.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

O presente trabalho teve por objetivos isolar e avaliar as ações antinociceptiva e antiinflamatória da lectina da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea*.

#### 3.2 Específico

- Extrair e isolar a lectina da alga marinha *P. capillacea* através de cromatografias sequenciais de troca iônica e afinidade;
- Avaliar a atividade da lectina *P. capillacea* em modelos clássicos de nocicepção;
- Avaliar a atividade da lectina *P. capillacea* em modelos clássicos de inflamação;
- Avaliar a toxicologia da lectina *P. capillacea* por dose repetida.

## 4. MATERIAS

### 4.1 Alga Marinha

A alga marinha vermelha *Pterocladia capilacea* (FIGURA 1) foi coletada em rochas do meso-litoral, durante maré baixa (-0,2 a 2,0 m) na Praia do Pacheco, município de Caucaia-CE (FIGURA 1).

### 4.2 Células Sangüíneas

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

### 4.3 Animais

Foram utilizados camundongos albinos variedade *Swiss* machos (20-25 g) e ratos *Wistar* machos (180-200 g) adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos em salas com temperatura ambiente adequada e livre acesso à ração e água no Biotério do Departamento de Bioquímica. Os ensaios com os animais seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança, respeitando o princípio dos 3 R's da experimentação animal ("reduction, replacement and refinement") recebendo aprovação da comissão de ética de pesquisa com animais de laboratório do comitê de ética da Universidade Federal do Ceará (CEPA N° 45/06).

#### 4.4 Fármacos e Reagentes

As drogas e reagentes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram:

Carragenina lambda (Sigma®, USA); Naloxona (Sigma®, U.S.A); Sulfato de Morfina (Dimorf®) (Cristália, Brasil); Indometacina (Sigma Chemical Co®, St. Louis, U.S.A); Formaldeído (PA, Merck®); Dexametasona, e Kit da Labtest®.

Acrilamida, N,N' - metileno bisacrilamida, TEMED, Coomassie Brilliant Blue G-250,  $\beta$ -mercaptoetanol, tripsina, foram obtidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.; Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e DEAE- Celulose, Sigma, USA.

Marcadores para eletroforese: Álcool desidrogenase 150,0 kDa; Albumina sérica bovina 66,0 kDa; Ovoalbumina 45,0 kDa; Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase 36,0; Anidrase carbônica 29,0 kDa; Tripsinogênio 24,0 kDa; Lactoalbumina 14,2 kDa e Aprotinina 6,5 kDa, Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Ácido acético (PA-Merck); Álcool comercial; Azul de Evans (Sigma); Hematoxilina e Eosina (Reagen); Cloreto de Sódio (NaCl); Tris-HCl, KCl,  $MgCl_2$ ,  $NaH_2PO_4^-$ ,  $NaHCO_3^-$ ,  $CaCl_2$  (Merck).



**Filo:** Rodophyta

**Classe:** Florideophyceae

**Ordem:** Gelidiales

**Família:** Gelidiaceae

**Gênero:** Pterocladia

**Espécie:** *Pterocladia capillacea* (S. G. Gmelin) Santelices & Hommersand)

FIGURA 1 – Alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea*



## 5. MÉTODOS

### 5.1 Extração e Purificação da Lectina (Pc) da Alga Marinha Vermelha *Pterocladia capillacea*

A lectina Pc purificada, foi obtida da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea*, através da metodologia descrita por OLIVEIRA et al., 2002, com algumas modificações (FIGURA 2).

A alga foi previamente lavada com água corrente e destilada, triturada em almofariz, em presença de nitrogênio líquido e submetida a extração protéica com tampão Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5 na proporção de 1:3 (p/v). O homogenato foi deixado em contato por 12 horas e em seguida filtrado em tecido de nylon. O filtrado obtido foi submetido a centrifugação, 6000 x g, 30 minutos, 6 °C sendo o resíduo descartado e o sobrenadante (extrato total) submetido a procedimentos cromatográficos de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e o extrato previamente dialisado contra o mesmo tampão de equilíbrio, aplicado na coluna. Após a completa eluição da fração não retida na coluna, foi realizado um “step wise” com o mesmo tampão de equilíbrio da coluna contendo NaCl nas concentrações de 0,3 M e 0,5 M para a eluição das frações protéicas adsorvidas na matriz. Durante os procedimentos cromatográficos foi mantido um fluxo constante de 30 mL/hora, coletando frações de 3 mL/tubo e a absorbância determinada a 280 nm. As frações ativas (presença de atividade hemaglutinante) obtidas foram dialisadas contra água destilada e aplicadas em cromatografia de afinidade em coluna de Goma de Guar, onde o pico ativo (PII) foi previamente eluído com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M.

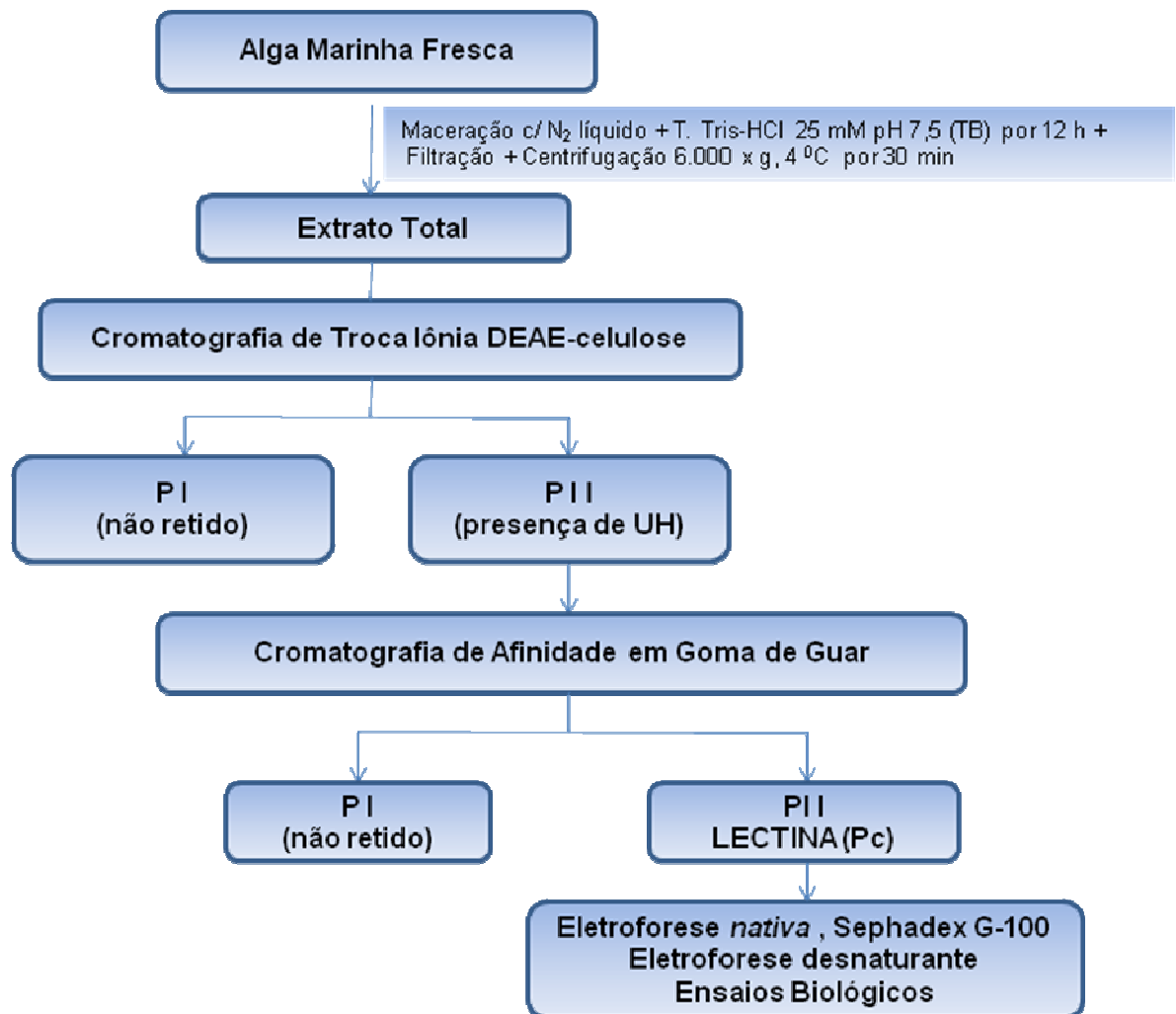


FIGURA 2: Esquema de extração e purificação da lectina Pc da alga marinha vermelha *P. capillacea*

## 5.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A pureza da lectina foi acompanhada por eletroforeses *Nativa* e desnaturante em gel de poliacrilamida 12% na presença e ausência de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, segundo o método de LAEMILLI descrito por HAMES & RICKWOOD, 1983.

Para montagem das placas, foi usado um gel de concentração (3,95% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl  $3 \times 10^3$  mM, pH 6,8 e um gel de separação (acrilamida 12,% dissolvida em tampão Tris-HCl  $3 \times 10^3$  mM, pH 8,8). A amostra liofilizada foi dissolvida em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,8, contendo glicerol a 26 %, SDS 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10% e traços de azul de bromofenol. Em seguida, a amostra foi incubada a 100 °C por 10 minutos. Alíquotas de 20  $\mu$ L foram aplicadas em poços previamente feitos no gel de concentração. A corrida eletroforética foi realizada a uma corrente constante de 40 mA por um período aproximado de 180 minutos. As bandas protéicas obtidas foram reveladas mediante coramento com uma solução de Coomassie R-250 a 2% dissolvido em ácido acético, metanol e água na proporção de (10:45:45) contendo ácido pícrico 0,2 M (STEPHANO et al., 1986). Como padrões protéicos, foram utilizadas proteínas de massas moleculares conhecidas: Albumina sérica bovina 66,0 kDa; Ovoalbumina 45,0 kDa; Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase 36,0 kDa ; Anidrase carbônica 29,0 kDa; Tripsinogênio 24,0 kDa; Inibidor de tripsina 20,0 kDa; Lactoalbumina 14,2 kDa; e Aprotinina 6,5 kDa) foram usadas como marcadores de massa molecular.

## 5.3 Determinação de Proteínas

As concentrações de proteínas solúveis no extrato total e nas etapas de purificação da lectina foram determinadas segundo o método de BRADFORD

(1976). Após 10 minutos de contato das amostras com o reagente Coomassie G-250, à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 595 nm (espectrofotômetro Spectronic 20). A concentração de proteínas foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA). Para estimativa das concentrações de proteínas nos eluatos das cromatografias foi utilizada a leitura de absorbância a 280 nm.

#### 5.4 Determinação da Atividade Hemaglutinante

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram feitos através de diluições seriadas em tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 100  $\mu$ L de NaCl 150 mM. No primeiro tubo foram adicionados 100  $\mu$ L da amostra e uma série de diluições duplas foram feitas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.), homogeneizando-se completamente antes de cada transferência. A cada diluição foram adicionados 100  $\mu$ L de eritrócitos a 2% e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos, conforme descrito por AINOUZ et al., 1992. Posteriormente, o ensaio foi centrifugado a 2.000 x g por 30 segundos e os resultados foram lidos macroscopicamente, sendo o título expresso em unidade de hemaglutinação (UH/mL), que é o inverso da maior diluição da amostra que apresentou nítida aglutinação.

#### 5.5 Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante

Para os ensaios de inibição da atividade hemaglutinante, uma alíquota da fração contendo a lectina de *P. capillacea*, encerrando 32 UH/mL (100  $\mu$ L), foi transferida para tubos de ensaio contendo igual volume de soluções diluídas em série (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.) a partir de soluções estoque de açúcares simples na concentração de 100 mM e de glicoproteínas na concentração de 5 mg/mL. Os tubos permaneceram 60 minutos à temperatura

ambiente e após este período foram adicionados 200  $\mu$ L de suspensão de eritrócitos de coelho a 2% tripsinizados. Os tubos foram deixados em repouso por mais 60 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 2.000 x g por 30 segundos.

A especificidade da lectina foi determinada observando-se os açúcares ou glicoproteínas capazes de inibir a atividade hemaglutinante e os resultados expressos com base na concentração mínima do composto que ainda foi capaz de causar hemaglutinação.

## 5.6 Estudo da Atividade Antinociceptiva

### 5.6.1 Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

O modelo das contorções abdominais foi induzido por ácido acético 0,8% segundo o método descrito por COLLIER et al 1968. Nesse experimento, foram empregados grupos de seis camundongos *Swiss* machos (20-25 g).

Inicialmente, os animais foram pré-tratados com a lectina Pc dissolvida em salina (NaCl 0,15 M) em diferentes doses (0,9; 8,1 e 72,9 mg/kg de peso do camundongo) por via i.v. Após 30 minutos foi aplicado ácido acético 0,8% por via i.p.

Para a confirmação de seu efeito na nocicepção, utilizou-se a maior dose (72,9 mg/kg; i.v) em conjunto com seu ligante (mucina 1,25 mg/mL), onde a mistura foi deixada em contato por 12 horas a 10 °C antes de sua aplicação. Além disso, aplicou-se mucina 1,25 mg/mL; i.v com o intuito de verificar sua interferência no resultado. A lectina também foi submetida a aquecimento de 80 °C durante 10 minutos para a confirmação de sua ação. Como controle negativo, foram realizadas administrações prévias utilizando salina (NaCl 0,15 M) por via i.v e como controles positivos, morfina e indometacina, ambas na dose de 5 mg/kg via s.c. As respostas foram avaliadas logo após administração

do ácido acético 0,8%, sendo a contagem do número de contorções (contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão das patas posteriores) realizada em intervalos de 5 min por um período de 30 min (FIGURA 3).



FIGURA 3 - Efeito do ácido acético 0,8 % administrado por via intra-peritoneal (extensão das patas posteriores) no ensaio das contorções abdominais.

### 5.6.2 Teste da Formalina

Este teste foi realizado seguindo a metodologia de DUBUISSON & DENNIS (1977) modificado por HUNSKAAR et al., 1985, sendo caracterizado por uma injúria tecidual local da pata, que induz dor tônica e inflamatória localizada. Para isto, 20 µL da solução de formalina 1% foi injetada na pata direita de camundongos *Swiss* machos (seis camundongos por dose) e o tempo de lambedura registrado simultaneamente durante 5 min (1ª fase, que corresponde ao estímulo químico direto dos nociceptores) e, após um período de 25-30 min (2ª fase, que envolve a inflamação) foi registrado, durante 5 min, o tempo de lambedura. Os camundongos foram pré-tratados com Pc nas concentrações de 0,9; 8,1 e 72,9 mg/kg por i.v (seis doses; seis camundongos por dose) 30 min antes da injeção intra-plantar (i.pl) de formalina. Indometacina (5 mg/Kg; s.c) e morfina (5 mg/Kg; s.c) foram usadas como controle positivo e, naloxona (2 mg/kg; s.c), 15 min antes da Pc, como antagonista opióide. A inibição do efeito antinociceptivo da Pc na dose de 72,9 mg/kg por i.v (seis camundongos por dose) foi realizada por incubação com seu hapteno mucina (1,25 mg/mL; i.v), por 1 hora a temperatura ambiente. A inibição da antinocicepção da Pc também foi avaliada para a mesma dose, após seu aquecimento por 10 min a 80 °C.



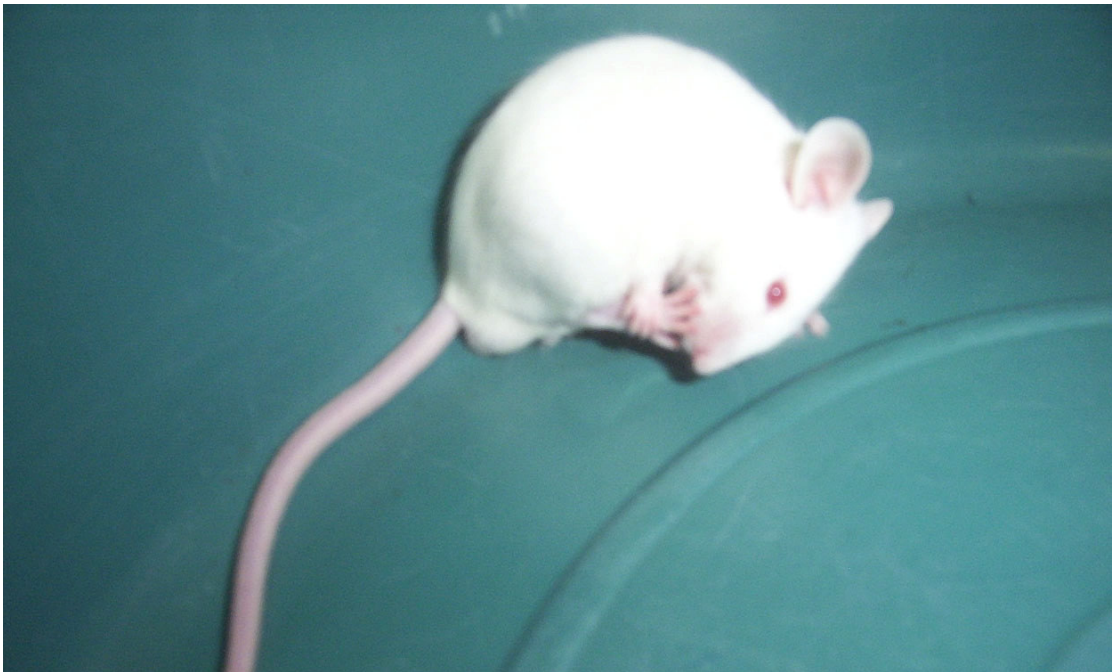


FIGURA 4 -.Efeito da formalina 1 % (lambadura), em camundongos administrada por via intraplantar.

### 5.6.3 Teste da Placa Quente

Este teste que mede a intensidade da atividade analgésica, foi realizado segundo EDDY & LEIMBACH, 1953. Inicialmente, camundongos *Swiss* machos foram pré-selecionados de acordo com suas reações a um estímulo térmico (saltos e/ou lambeduras das patas traseiras quando colocados sobre uma placa aquecida a  $51 \pm 1$  °C) em um intervalo de até 20 s. Em seguida, 30 min após administração da Pc na dose de 72,9 mg/kg por i.v (seis camundongos por dose), os tempos de latência foram observados durante 30, 60 e 90 min. Como controles positivos, utilizou-se morfina (5 mg/kg; s.c) e indometacina (5mg/kg; s.c) e como controle negativo salina (NaCl 0,15 M).

### 5.7 Ensaio da Contratilidade Duodenal *in vitro*

Para verificar se o efeito antinociceptivo da Pc estaria relacionado ao movimento do íon  $Ca^{++}$ , realizou-se o ensaio da contratilidade duodenal *in vitro*, segundo a metodologia descrita por EASON & ARONSTAM, 1984, com algumas modificações. Utilizou-se ratos *Wistar* (180-200 g) mantidos em jejum prévio de 24 horas, com livre acesso à água para a retirada do duodeno. Os animais foram sacrificados mediante deslocamento cervical. Após isolamento duodenal, este foi submetido a limpeza interna em uma solução de Tyrode (NaCl 136 mM, KCl 2,6 mM,  $MgCl_2$  0,98 mM,  $NaH_2PO_4$  0,36 mM,  $NaHCO_3$  11,9 mM,  $CaCl_2$  2 mM e Glicose 5,5 mM para 1 L, pH 7,40) retirando-se também o excesso de gordura e mesentério, mas sem interromper a continuidade da parede do tubo digestivo. Em seguida, os segmentos do duodeno (2 cm) foram acondicionados numa cuba de vidro com capacidade de 5 mL, contendo solução de Tyrode pré-aquecida à temperatura de 36,5 °C e submetida a constante aeração. Os segmentos foram dispostos em sentido longitudinal e uma das extremidades fixas em um gancho da cuba enquanto a outra foi ligada a um transdutor de tensão o qual responde ao mínimo de estímulo. Neste

experimento, foi utilizado como padrão KCl 60 mM seguido da adição em intervalos de 3 minutos de Pc diluída nas concentrações cumulativas de 8 µg/mL, 16 µg/mL e 30 µg/mL em volumes que variaram de 1,25 µL a 40 µL, partindo-se de uma concentração de 8,1 mg/mL.

## 5.8 Estudo da Atividade Antiinflamatória

### 5.8.1 Ensaio da Migração de Neutrófilos Induzida por Carragenana (Cg)

Para a determinação da migração de neutrófilos na cavidade peritoneal, Pc (8,1 mg/kg) foi administrada i.v. (seis ratos por dose) 30 min antes da administração do estímulo inflamatório por injeção intraperitoneal de carragenana (500 µg/cavidade) dissolvida em 1 mL de salina (NaCl 0,15 M). Utilizou-se como grupo controle salina estéril i.v, carragenana i.p (500 µg/cavidade) e Dexametasona (1 mg/kg; s.c) que foi utilizada como antiinflamatório de referência, sendo injetada uma hora antes da carragenana.

A migração de neutrófilos foi avaliada após 4 horas, onde os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através da lavagem desta injetando-se 10 mL de salina (NaCl 0,15 M) 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.

As contagens total e diferencial dos leucócitos foram realizadas conforme metodologia descrita anteriormente por SOUZA & FERREIRA, 1985. Neste procedimento, 20 µL do fluido coletado de cada animal foi diluído 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 foi centrifugado em citocentrífuga a 400 x g, durante 10 min, após este processo os esfregaços foram corados pelo método de Hematoxilina-

Eosina (HE) e as células contadas através de microscopia óptica sendo os resultados expressos com a média  $\pm$  E.P.M. do número de células  $\times 10^3$ /mL de fluido peritoneal.

#### 5.8.2 Ensaio do Edema de Pata Induzido por Carragenana (Cg)

O modelo do edema de pata induzido por Cg foi realizado segundo o método de WINTER et al., 1962. Os volumes da pata direita traseira de cada animal foram medidos através de pletismômetro (FIGURA 5) antes da injeção dos estímulos inflamatórios (tempo zero). Administrou-se Pc (8,1 mg/kg; i.v), dexametasona (1 mg/kg; i.v) como controle positivo e solução salina (NaCl 0,15 M) controle negativo. A carragenana (500  $\mu$ g/pata) foi administrada por via intraplantar (40  $\mu$ L), diluída em 0,1 mL de solução salina (NaCl 0,15 M). Os volumes das patas foram medidos 1, 2, 3 e 4 horas após a administração dos agentes inflamatórios. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pelas patas em um determinado tempo após o estímulo e antes do estímulo (tempo zero). Os volumes foram expressos em mm<sup>3</sup> e comparados àqueles obtidos das patas dos animais injetados com o estímulo inflamatório ou com apenas 0,1mL de salina (NaCl 0,15 M).



FIGURA 5- Pletismômetro utilizado para a medição do edema. Neste experimento, as patas traseiras do animal são estendidas e introduzidas no Pletismômetro (Ugo Basile, Itália) até a borda póstero-proximal da proeminência do calcanhar e, em seguida, o volume de líquido deslocado ( $V_1$ ) antes da injeção de carragenana ( $t=0$ ), sendo então registrado em um monitor digital.

## 5.9 Avaliação da Toxicidade Aguda por Dose Repetida

Para a avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas, a *P. capillacea* foi administrada por um período de curta duração. Dessa forma, camundongos machos (20-25 g) foram tratados por via i.v com Pc nas doses repetidas de 8,1 mg/kg durante seis dias consecutivos em grupos de oito animais e observados até o dia seguinte, sendo mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica com livre acesso a água e ração. No sétimo dia, os animais foram anestesiados e amostras de sangue foram coletadas do plexo retro orbitário e centrifugadas para a obtenção do plasma para posteriores dosagens bioquímicas de Uréia, Fosfatase Alcalina e Transaminases Glutâmico-Oxaloacético e -Pirúvica (TGO e TGP). Em seguida, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, seguido da retirada dos órgãos rim e fígado para posterior pesagem, mantendo correlações com as respectivas massas corpóreas.

Todos os parâmetros toxicológicos observados foram comparados a de animais que receberam apenas o controle negativo salina (NaCl 0,15 M), nas mesmas condições que os animais tratados.

## 5.10 Análise Bioquímica Enzimática do Plasma

### 5.10.1 Dosagem de Uréia

Com a finalidade de observar possíveis alterações na função renal dos animais, após administração diária de Pc (8,1 mg/kg; i.v) durante seis dias, obteve-se o plasma a partir do sangue coletado e desse total, 50 µL de cada animal foi utilizado para a dosagem de uréia, segundo a metodologia descrita no Kit da Labtest® (Cat. 27, ANVISA 10009010011) e utilizado absorvância de 600 nm em espectrofotômetro Spectronic 20. Esta metodologia baseia-se em um sistema

enzimático-colorimétrico, cuja intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra.

#### 5.10.2 Dosagem de Fosfatase Alcalina

A dosagem de fosfatase alcalina foi realizada com a finalidade de observar possíveis alterações na função hepática dos animais, após administração diária de Pc 8,1 mg/kg; i.v durante seis dias, onde obteve-se o plasma a partir do sangue coletado e do qual, 25 µL de cada animal foi utilizado para a dosagem, sendo esta realizada segundo a metodologia descrita no Kit da Labtest® (Cat. 40, ANVISA 10009010081). Trata-se de um método colorimétrico, cuja absorbância foi obtida no comprimento de onda de 590 nm em espectrofotômetro Spectronic 20.

#### 5.10.3 Dosagem das Transaminases Glutâmico Oxalacética (TGO/AST) e Glutâmico Pirúvica (TGP/ALP)

No intuito de verificar possíveis alterações diante da administração diária de Pc na dose de 8,1 mg/kg, achou-se necessário realizar tais dosagens.

As dosagens enzimáticas do plasma foram realizadas de acordo com o Kit da Labtest® (Cat. 52 e 53, ANVISA 10009010031 e 10009010027, respectivamente). A enzima Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO/AST) é uma enzima liberada no sangue quando ocorre uma lesão hepática, cardíaca, muscular ou cerebral. Do mesmo modo, a enzima Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP/ALT) também é liberada no sangue quando ocorre lesão hepática. Portanto, sua mensuração é útil na detecção de lesão celular hepática.

O procedimento para a dosagem da enzima Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO/AST) consistiu em adicionar 50 µL do substrato TGO (solução de 0,2 M de L- aspartato, 0,002 M α-cetoglutarato, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e em seguida, colocá-lo em banho-maria a 37 °C por 2 min, seguido da adição de 10 µL

da amostra (plasma) de cada animal e incubado a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 50 µL do reagente de cor (solução 0,001 M de 2,4 Dinitrofenilhidrazina), homogeneizado e deixado em repouso à temperatura ambiente (20-30 °C), durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 µL de hidróxido de sódio 0,4 M e a solução foi deixada em repouso durante 5 minutos, a temperatura ambiente (20-30 °C). As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 505 nm.

Para a dosagem de Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP/ALT), o procedimento consistiu em adicionar 50 µL de substrato TGP (solução de 0,2 M de L-alanina, 0,002 M α-cetoglutarato, tampão de fosfatos 0,1 M ph 7,4) e colocação em banho-maria a 37 °C, seguido da adição de 10 µL da amostra (plasma), homogeneizado e incubado a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 50 µL do reagente de cor (solução 0,001 M de 2,4 Dinitrofenilhidrazina), homogeneizado e deixado em repouso à temperatura ambiente (20-30 °C), durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 µL de hidróxido de sódio 0,4 M e a solução deixada em repouso durante 5 min, a temperatura ambiente (20-30 °C). As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro Spectronic 20 a 505 nm.

### 5.11 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ .



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 Determinação da Inibição da Atividade Hemaglutinante

O ensaio referente à inibição da atividade hemaglutinante (TABELA 1) mostrou que no extrato da alga marinha *P. capillacea*, a atividade não foi inibida por açúcares simples e pelo próprio polissacarídeo da alga. Além disso, das glicoproteínas testadas somente a glicoproteína mucina, na concentração de 0,625 mg/mL, foi capaz de inibir a atividade hemaglutinante. Este resultado está de acordo com o obtido por OLIVEIRA et al., 2002, sendo de grande valia para a posterior utilização da glicoproteína mucina nos ensaios de antinocicepção para confirmação do possível efeito antinociceptivo da Pc através do envolvimento de seu sítio lectínico. A mucina poderia ter sido utilizada como ligante para a purificação da lectina em estudo, mas devido a forte interação da mucina com a proteína, seria necessário a utilização de um agente desnaturante (uréia) para sua eluição, que poderia comprometer a integridade da coluna de afinidade e da própria lectina.

### 6.2 Purificação da Lectina da Alga Marinha Vermelha *Pterocladia capillacea*

A lectina da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea* (Pc) foi purificada por aplicação do extrato total em cromatografias sequenciais de troca-iônica e afinidade em colunas de DEAE-celulose e Goma de Guar, respectivamente. O procedimento de troca-iônica mostrou a presença de três picos protéicos, onde o primeiro (PI) pigmentado, não retido na coluna e livre de atividade hemaglutinante foi eluído com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. O segundo pico (PII) foi eluído com o mesmo tampão anterior contendo 0,3 M de NaCl apresentando-se pigmentado e com atividade hemaglutinante (FIGURA 6). A amostra obtida foi dialisada e aplicada em coluna de afinidade Goma de Guar (FIGURA 7), obtendo-se dois picos, sendo o

segundo pico (PII), ativo e isento de pigmentos, eluído com solução tampão glicina 0,1 M, pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M. A fração protéica (PII), após diálise contra água e liofilização foi utilizado para verificação do seu grau de pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida e para os ensaios de atividades antinociceptiva e antiinflamatória. Para a verificação do grau de pureza, O PII foi submetido aos procedimentos de eletroforese *Nativa* (PAGE) (FIGURAS 8) e desnaturante (PAGE-SDS), tendo apresentado uma única banda eletroforética, para os dois sistemas, que é uma prova consistente da pureza da lectina. Ao ser incubada com SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol (100 °C, 5 min) foi revelado apenas uma única banda protéica de massa molecular de 36,1 kDa (FIGURA 9). O procedimento de purificação levou a um rendimento de 3% de lectina partindo-se de 500g de alga fresca (TABELA 2). Esse baixo rendimento pode ser comparado com o encontrado pela purificação da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (BENEVIDES et al., 2001) e das lectinas das algas marinhas vermelhas *Vidalia obtusiloba* (MELO et al.,2004), *Gracilaria cornea* (LIMA et al., 2005) e *Gracilaria ornata* (LEITE et al., 2005).

TABELA 1 - Ensaio de inibição do extrato total da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea*

<b>AÇÚCARES/GLICOPROTEÍNAS</b>	<b>CONCENTRAÇÃO MÍNIMA*</b>
<b>AÇÚCARES SIMPLES</b>	(mM)
D(+) GALACTOSE	-
D(+) GLUCOSE	-
D(+) GALACTOSAMINA	-
$\alpha$ - L- FUCOSE	-
D(+) FUCOSE	-
$\alpha$ -LACTOSE	-
D-FRUTOSE	-
MELIBIOSE	-
<b>GLICOPROTEÍNAS</b>	(mg/mL)
MANANA	-
MUCINA	0,625 mg/mL
<b>POLISSACARÍDEO</b>	(mg/mL)
POLISSACARÍDEO SULFATADO	-

(-) Ausência de inibição da atividade hemaglutinante

\*Concentração mínima dos açúcares simples, glicoproteínas e polissacarídeo sulfatado capaz de inibir a atividade hemaglutinante

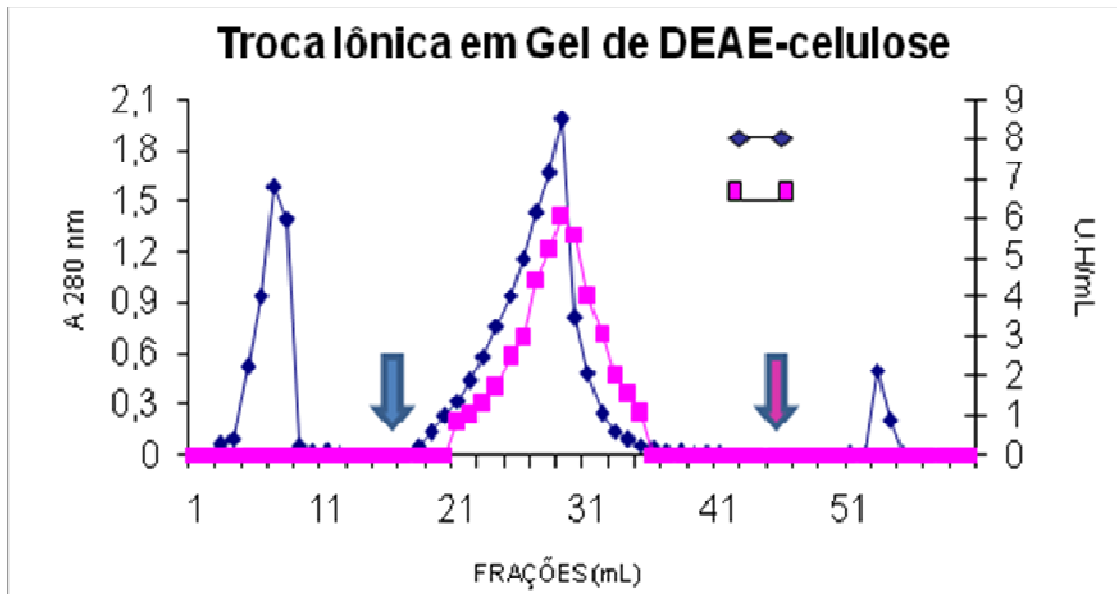


FIGURA 6 - Cromatografia de troca iônica em gel de DEAE-celulose do extrato total da alga *P. capillacea* equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. As frações foram eluídas por “step wise” com tampão de equilíbrio contendo NaCl 0,3 e 0,5 M. Frações 3 ml/tubo (  $\blacklozenge$  )  $A_{280}$  e atividade hemaglutinante (  $\blacksquare$  )

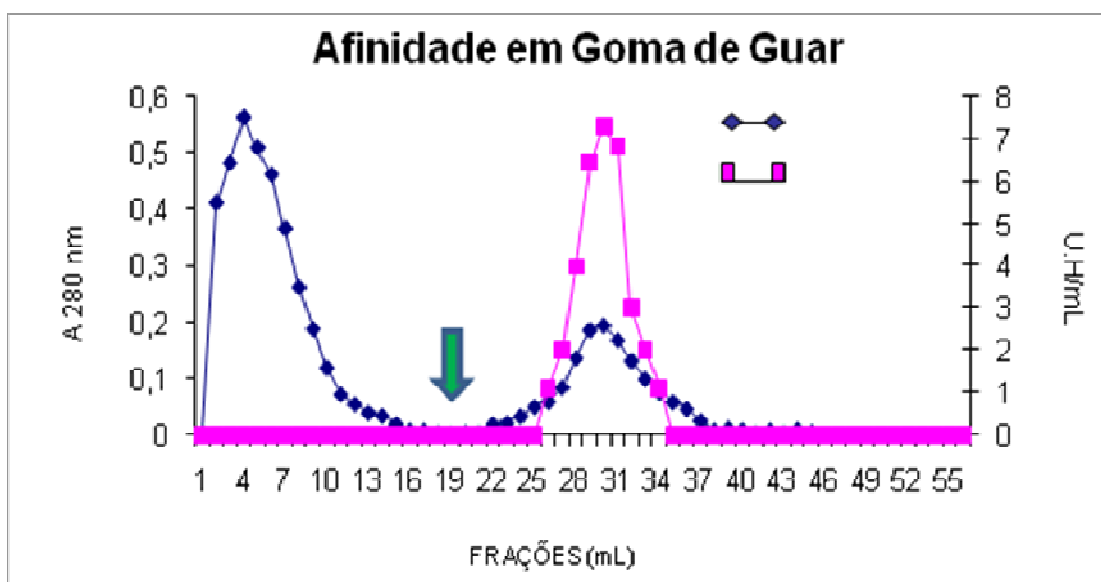


FIGURA 7 - Cromatografia de Afinidade em coluna de Goma de Guar do PII da DEAE-celulose. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. O pico ativo (PII) foi eluído com tampão glicina 0,1 M, pH 2,6 contendo 0,15 M de NaCl. Frações 3 mL/tubo (  $\blacklozenge$  )  $A_{280}$  e atividade hemaglutinante (  $\blacksquare$  )



FIGURA 8 - Eletroforese *Nativa* em gel de poliacrilamida 12 % do PII da cromatografia de afinidade da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea*.

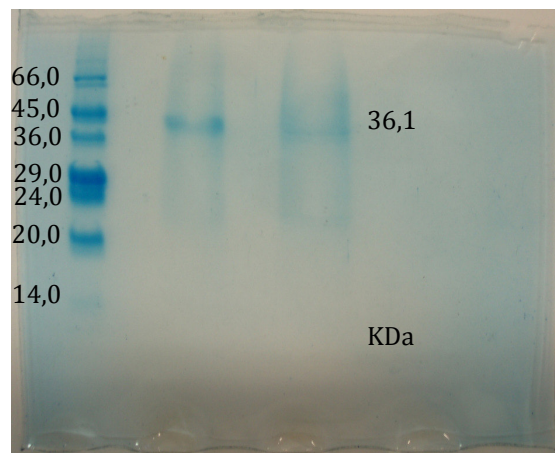


FIGURA 9 - PAGE-SDS da lectina Pc da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea*. 1. Marcadores (66,0; 45,0; 36,0; 29,0; 24,0; 20,0; 14,2 e 6,5 kDa) 2. Lectina na presença de SDS e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol 3. Lectina na presença de SDS e de  $\beta$ -mercaptoetanol.

TABELA 2 - Purificação da lectina Pc da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea*

FRAÇÕES	PROTEÍNA TOTAL* (mg)	RENDIMENTO PROTÉICO (%)	ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE		CMA****
			TOTAL**	ESPECÍFICA***	
EXTRATO TOTAL	115,2	100	28800	250	4
PII DEAE	43,8	38	14080	321,4	3
PII GUAR	3,3	3	8960	2715	0,3

\* Obtida a partir de 500g de alga

\*\* U.H Total- Unidades de hemaglutinação total

\*\*\* U.H/mg de proteína

\*\*\*\*Concentração mínima capaz de causar hemaglutinação (µg/mL) capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos tripsinizados de coelho (2%)

### 6.3 Estudo da Atividade Antinociceptiva

O efeito antinociceptivo da lectina Pc foi investigado através da utilização de modelos clássicos de testes nociceptivos, induzidos por estímulos químicos como o das contorções abdominais induzidas por ácido acético e do tempo de lambertura da pata induzida por formalina 1%, bem como induzidos por estímulo térmico, através do teste da placa quente. O uso de molécula nestes modelos é importante para averiguar a percepção de diferentes tipos de nocicepção, revelando a verdadeira natureza da substância investigada. Os estímulos químicos utilizados provavelmente são os que mais se aproximam da dor clínica aguda (LE BARS et al., 2001).

#### 6.3.1 Efeito da Pc no Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

A Pc nas doses de 0,9; 8,1 e 72,9 mg/kg foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8% quando comparados ao grupo controle, obtendo-se uma redução de 29,9; 39,3 e 51,9%, respectivamente (TABELA 3 e FIGURA 10), mostrando que a lectina inibiu de forma dose-dependente as contorções. A morfina e indometacina, utilizadas como controles positivos, reduziram as contorções em 97,5 e 40,5%, respectivamente. Quando os animais receberam a Pc associada ao seu hapteno mucina ou na forma desnaturada a 80 °C por 10 min, não foi possível observar diminuição das contorções de forma significativa (TABELA 3 e FIGURA 11) comprovando sua ação antinociceptiva.

O efeito inibitório da mucina sobre a atividade antinociceptiva da lectina foi revertido através da administração intra-venosa da Pc na dose de 72,9 mg/kg. A utilização desta dose, também demonstra que a Pc apresenta efeito maior do que o controle positivo indometacina (5 mg/kg) (TABELA 3).

Trata-se de um modelo de nocicepção periférica, onde a irritação local desencadeia a liberação de vários mediadores como a bradicinina, substância P e prostaglandinas, bem como citocininas. Tais mediadores ativam nociceptores quimiosensíveis que contribuem com o desenvolvimento da dor de origem inflamatória, sendo uma ferramenta para a avaliação da atividade analgésica e antiinflamatória de novos compostos. Apesar de ser um modelo pouco específico, apresenta boa sensibilidade e por isso, é ferramenta importante para a avaliação de atividade analgésica e antiinflamatória de novos compostos (IKEDA et al., 2001).

Os resultados de nocicepção obtidos para a Pc e usando-se este modelo, também foram observados para a lectina da alga marinha *Amansia multifida* que injetada nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg, inibiu de forma significativa as contorções em 28, 79, 87%, respectivamente (NEVES et al., 2007). De maneira semelhante BITENCOURT et al., 2008 demonstraram que a lectina da alga *Hypnea cervicornis* nas doses 0,1, 1 10 mg/kg também foi capaz de inibir as contorções em camundongos (62, 42 e 72%, respectivamente).

Desta forma, o resultado obtido sugere que o efeito antinociceptivo da Pc possa estar relacionado à inibição da liberação de mediadores e pela inibição da migração de células que provocariam o processo doloroso.



TABELA 3 - Efeito antinociceptivo da Pc na ausência e presença de seu hapteno (mucina), no teste das contorções abdominais em camundongos

SUBSTÂNCIAS	DOSE (mg/kg; via)	MÉDIA do Nº de CONTORÇÕES <sup>a</sup>	% de INIBIÇÃO
Controle (NaCl 0,15 M)	-	62,9 ± 1,3	-
Morfina	5; s.c	1,7 ± 1,5 *	97,5
Indometacina	5; s.c	41,2 ± 4,0 *	40,5
Pc	0,9; i.v	48,5 ± 1,0 *	29,9
	8,1; i.v	40,0 ± 2,1 *	39,3
	72,9; i.v	33,3 ± 3,0 *, #	51,9
Pc + Mucina	72,9 + 1,25 mg/mL; i.v	59,7 ± 2,8 #	Ns**
Mucina	1,25 mg/mL; i.v	66,6 ± 0,8	Ns**
Pc a 80 °C/ 10 min	72,9mg/kg; i.v	62,7 ± 3,7	Ns**

<sup>a</sup> Média do número de contorções abdominais tendo por base o número de animais

(6/grupo) \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle salina (NaCl 0,15 M) #  $p < 0,05$  em relação às doses (Pc) (ANOVA; Bonferroni). \*\* Valores não significativos

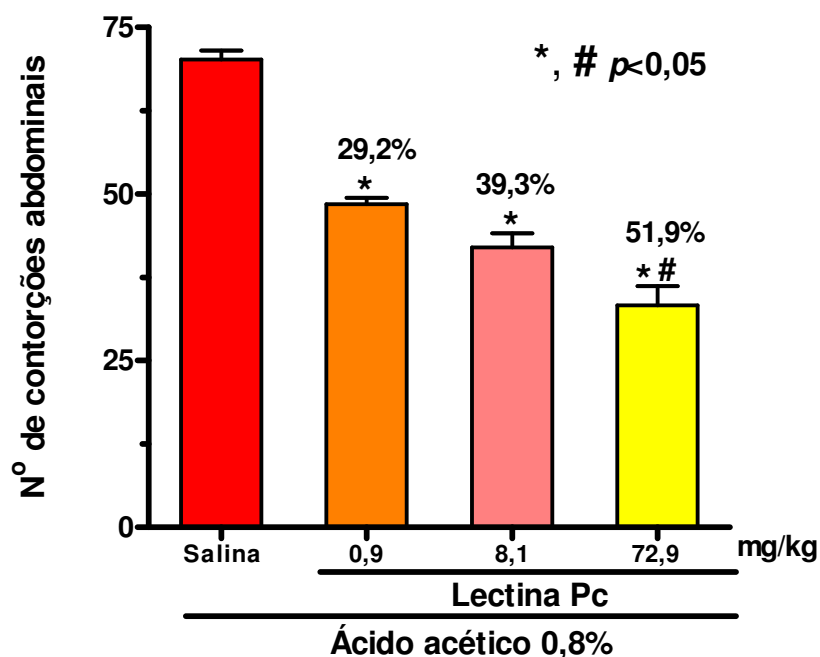


FIGURA 10 - Estudo da atividade antinociceptiva da lectina Pc em modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8%. Os animais (6/grupo) foram tratados 30 min antes da aplicação de ácido acético 0,8% i.p, com salina; i.v (NaCl 0,15 M) e Pc (0,9; 8,1 e 72,9 mg/kg; i.v). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do número de contorções. \*  $p < 0,05$ , indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle salina (NaCl 0,15 M) #  $p < 0,05$  indica diferença estatística significativa quando comparado as doses de Pc. (ANOVA; Bonferroni)

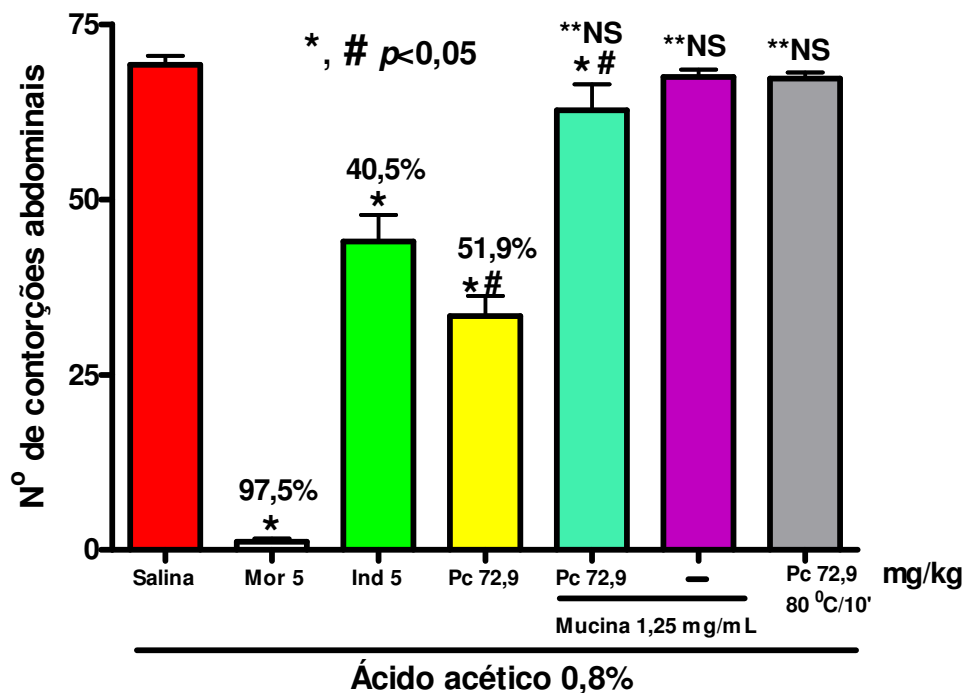


FIGURA 11 - Estudo da atividade antinociceptiva da lectina Pc em modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8 %. Os animais (6/grupo) foram tratados 30 min antes da aplicação de ácido acético 0,8% i.p, com salina; i.v (NaCl 0,15 M), mucina (1,25 mg/mL), morfina (5 mg/kg; s.c), indometacina (5 mg/kg; s.c) e Pc (72,9 mg/kg; i.v) associada a seu ligante mucina (1,25 mg/mL) e desnaturada (80 °C/10 min). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do número de contorções. \*  $p < 0,05$ , indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle salina (NaCl 0,15 M) #  $p < 0,05$  indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo Pc (72,9 mg/kg). (ANOVA; Bonferroni)

### 6.3.2 Efeito da Pc no Teste da Formalina

A Pc quando administrada em camundongos por i.v nas doses de 0,9, 8,1 e 72,9 mg/kg, 30 min antes da formalina, mostrou efeito antinociceptivo, reduzindo o tempo de lambedura da pata na primeira (38, 48 e 58%, respectivamente) e segunda fase (49, 79 e 87%), do teste em comparação ao grupo controle (TABELA 4 e FIGURA 12). Como esperado o controle positivo morfina (5 mg/kg; s.c) reduziu significativamente a resposta a formalina em ambas as fases, onde o tempo de lambedura variou de 67% na primeira fase a 73% na segunda fase. Entretanto, o controle positivo indometacina utilizada na mesma dose (5 mg/kg; s.c) apresentou uma redução menor no tempo de lambedura que variou de 33% (primeira fase) a 43% (segunda fase). Quando a morfina foi associada com seu antagonista naloxona (2 mg/kg; i.p) seu efeito inibitório foi de 25% (primeira fase) e 51% (segunda fase), enquanto que a Pc (72,9 mg/kg; i.v) associada a naloxona (2 mg/kg; i.p) teve efeito inibitório maior na segunda fase (inflamatória), variando portanto, de 18% (primeira fase) a 65% (segunda fase). A Pc (72,9 mg/kg; i.v) também avaliada em associação a seu açúcar ligante mucina (1,25 mg/mL; i.v) ou aquecida (80 °C, 10 min) não mostrou inibição significativa no tempo de lambedura da pata em ambas as fases (TABELA 4 e FIGURA13). Portanto, neste estudo o resultado obtido sugere que a Pc além da atividade antinociceptiva apresenta uma ação antiinflamatória acentuada.

Este teste permite avaliar a resposta de um animal a dor contínua e moderada ocasionada por injúria tecidual, sendo considerado um teste específico e muito usado para o estudo de nocicepção. Caracteriza-se por apresentar resposta ao estímulo químico na forma bifásica e distinta, sendo a primeira fase considerada neurogênica e a segunda inflamatória em resposta a um estímulo químico (BRAGGIO et al., 2002). Uma vez que a Pc inibiu a resposta nociceptiva em ambas fases nas três concentrações testadas, buscou-se avaliar sua ação central em um teste mais específico a agentes de ação central como o teste da placa quente.

TABELA 4 - Efeito antinociceptivo da lectina Pc na ausência e presença de seu hapteno (mucina), no teste da formalina em camundongos

<b>SUBSTÂNCIAS</b>	<b>DOSE (mg/kg; via)</b>	<b>1ª FASE (0-5min)</b>	<b>% de INIBIÇÃO</b>	<b>2ª FASE (20-25 min)</b>	<b>% de INIBIÇÃO</b>
Controle (NaCl 0,15 M)	-	70,7 ± 0,8	-	45,3 ± 1,8	-
Morfina	5; s.c	23,6 ± 1,4*	67	12,0 ± 0,9*	73
Indometacina	5; s.c	47,4 ± 1,6*	33	26 ± 1,3*	43
Morfina + Naloxona	5; s.c + 2; i.p	53,3 ± 2,3§	25	22,0 ± 2,0*, §	51
Pc + Naloxona	72,9; i.v + 2; i.p	58,0 ± 2,0§	18	16,0 ± 1,7*, §	65
Pc	0,9; i.v	43,8 ± 1,3*, #	38	23,0 ± 1,3*, #	49
	8,1; i.v	37,0 ± 1,5*, #	48	9,6 ± 2,0*	79
	72,9; i.v	29,4 ± 2,0*, #	58	5,8 ± 2,4*, #	87
Pc + Mucina	72,9; i.v + 1,25 mg/mL; i.v	62,0 ± 2,0	**NS	38,4 ± 1,7	**NS
Mucina	1,25 mg/mL; i.v	64,4 ± 1,7	**NS	38,4 ± 2,0	**NS
Pc a 80 °C/ 10 min	72,9; i.v	64,0 ± 2,5	**NS	40,0 ± 1,8	**NS

Os valores representam a média±E.P.M. do tempo de lambadura em segundos em cada fase. (6/grupo) \*, #, § p<0,05 comparado com o controle salina (NaCl 0,15 M).

ANOVA; Bonferroni. \*\* Valores não significativos

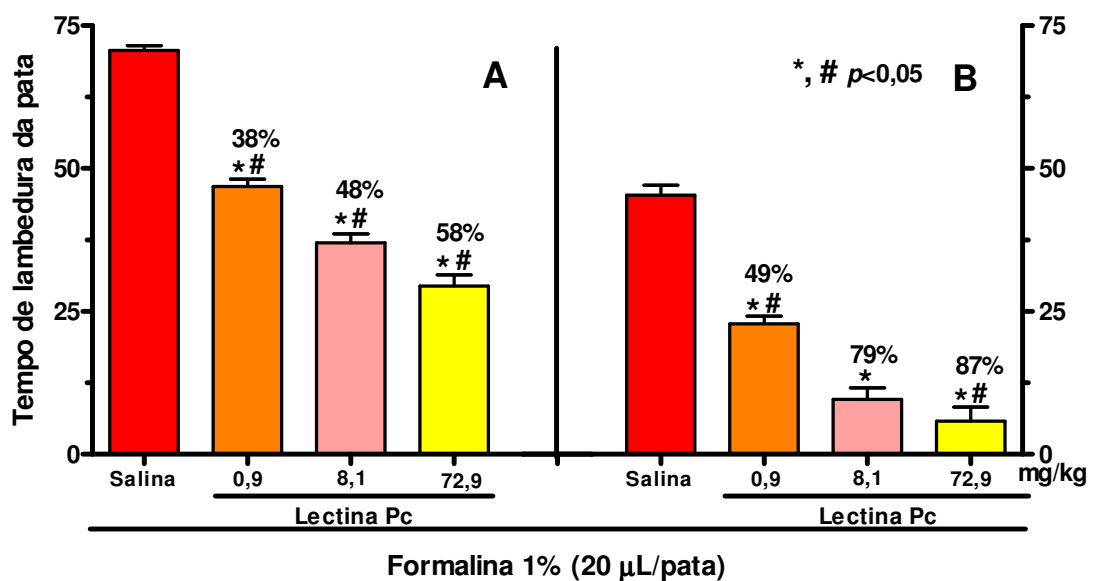


FIGURA 12 - Efeito da Pc no teste da formalina em camundongos. Os animais (6/grupo) foram tratados 30 min antes da injeção intraplantar de formalina 1 % com salina; i.v (NaCl 0,15 M) e Pc (0,9; 8,1 e 72,9 mg/kg; i.v). Imediatamente após a administração da formalina o tempo de lambedura foi registrado por cerca de 5 min (1ª fase-painel A) e de 20 à 25 min (2ª fase-painel B). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do tempo de lambedura. \* $p < 0,05$ , indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle salina (NaCl 0,15 M) # $p < 0,05$ , indica diferença significativa entre as doses de lectina. (ANOVA; Bonferroni)

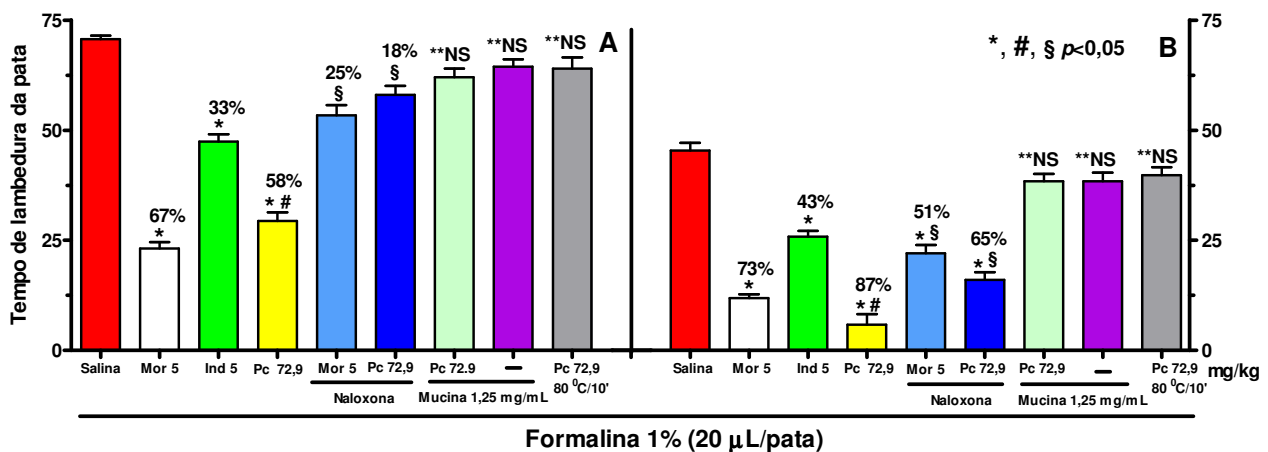


FIGURA 13 - Efeito da Pc no teste da formalina em camundongos frente a controles negativo e positivo. O efeito da Pc no teste da formalina (i.pl a 1 %) em camundongos (6/grupo) pré-tratados (30 min) antes. Utilizou-se controle negativo salina i.v (NaCl 0,15 M) e positivos: morfina (5mg/kg; s.c) e indometacina (5mg/kg; s.c); lectina (0,9; 8,1 e 72,9 mg/kg, i.v); naloxona + morfina (2 mg/kg, i.p + 5 mg/kg, i.v, respectivamente); morfina + Pc (5 mg/kg, i.v + 72,9 mg/kg, i.v, respectivamente); mucina 1,25 mg/mL e Pc aquecida a 80 °C durante 10 minutos. Imediatamente após a administração da formalina o tempo de lambedura foi registrado: painel A 1ª fase (5 min) e painel B 2ª fase (20 a 25 min), os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \*, §  $p < 0,05$ , indica diferença estatística do tempo de lambedura em relação a salina (NaCl 0,15 M) #  $p < 0,05$ , indica diferença à Pc 72,9 mg/kg segundos em cada fase. (ANOVA; Bonferroni)

### 6.3.3 Efeito da Pc no Teste da Placa Quente

Este ensaio mostrou que a Pc na dose de 72,9 mg/kg não promoveu aumento da média do tempo de reação ao estímulo térmico, quando comparado ao grupo controle, morfina (5 mg/kg), que provocou um aumento significativo do tempo de reação ao estímulo térmico (TABELA 5).

Contrariamente ao observado com a Pc e indometacina, o controle positivo morfina (5 mg/kg; s.c), mostrou uma elevada antinociceptiva, justificada pelo decréscimo na média do tempo de reação durante os tempos de 0, 30, 60 e 90min ( $10,4 \pm 0,6$ ,  $34,1 \pm 1,8$ ,  $30,0 \pm 1,4$  e  $23,1 \pm 2,6$  s, respectivamente) (FIGURA 14). Portanto, os resultados obtidos com a Pc neste modelo, sugerem que sua atividade antinociceptiva não está relacionada aos receptores opióides centrais e que possivelmente atue por mecanismo periférico. Estes resultados são semelhantes aos obtidos para a atividade antinociceptiva de ação periférica da lectina da alga *Hypnea cervicornis* (BITENCOURT et al., 2008), mas diferem dos obtidos para a lectina da alga *Amansia multifida* que apresentou efeitos antinociceptivos de ação central e periférica (NEVES et al., 2007).

A nível espinhal, a morfina inibe a transmissão dos impulsos nociceptivos através do corno dorsal e suprime os reflexos nociceptores espinhais, inibindo a liberação da substância P. Os efeitos mais importantes desta substância são sobre o SNC e o sistema gastrointestinal (RANG et al., 2007).

Após a realização deste ensaio, achou-se necessário a realização posterior de ensaios de cunho inflamatório, já que a lectina em estudo mostrou ação considerável diminuindo o tempo de lambadura na segunda fase do teste da formalina.

Trabalhos recentes têm mostrado efeito antinociceptivo de lectinas de algas tanto a nível central como periférico. Segundo VIANA et al., 2007 a lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida*, demonstrou ambos efeitos.



Os testes utilizados até o momento apresentam diferentes propriedades e são muito úteis como ferramentas, não somente para avaliar a potência de um analgésico, mas também para elucidar os mecanismos de dor e analgesia.

TABELA 5 - Efeito da lectina Pc no teste da placa quente em camundongos

GRUPO	DOSE (mg/kg; via)	TEMPO			
		0 min	30 min	60 min	90 min
CONTROLE (NaCl 0,15 M)	-	6,8±0,8	7,3±1,1	6,2±0,6	5,3±0,4
MORFINA	5; i.v	10,4±0,6	34,1±1,8*	30,0±1,4*	23,1±2,6 *
INDOMETACINA	5; i.v	8,1±1,0	6,7±1,0	4,8±0,8	4,1±0,6
Pc	72,9; i.v	6,0±0,6	4,8±0,6	4,6±0,6	3,4±0,2

Os valores representam a média ± E.P.M. do tempo de reação em (s).

\* p<0,05 comparado com o controle salina (NaCl 0,15 M).

(ANOVA; Bonferroni).

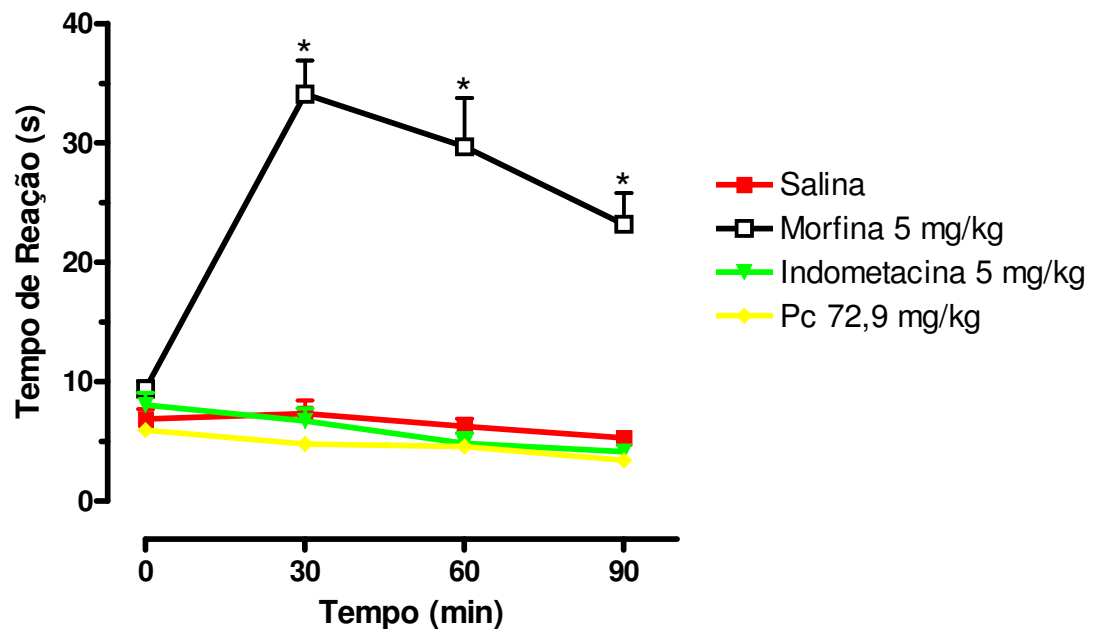


FIGURA 14 - Efeito da Pc sobre placa quente. O gráfico representa o tempo (s) de reação que o animal leva para responder ao estímulo térmico em placa aquecida a  $51 \pm 1$  °C. Antes do estímulo térmico, os animais (6 /grupo) foram tratados 30 min antes com salina; i.v (NaCl 0,15 M), morfina (5 mg/kg; s.c), indometacina (5 mg/kg; s.c) e Pc (72,9 mg/kg; i.v). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. do tempo de lambertura em segundos em cada fase. \* $p < 0,05$  comparado com o controle salina (NaCl 0,15 M). (ANOVA; Bonferroni).

#### 6.4 Efeito da Pc sobre a Contratilidade Duodenal *in vitro*

Este experimento permitiu observar que a lectina não apresentou nenhum efeito significativo sobre a contratilidade duodenal na concentração utilizada (FIGURA 15). Em contraste, estudo semelhante foi realizado com o uso de miricitrina, a qual alterou o movimento de íons cálcio, sugerindo que o bloqueio dos canais de cálcio contribuem para a ação antinociceptiva (MEOTTI et al., 2007). Esse resultado com a aplicação da Pc, permite confirmar que seu efeito antinociceptivo não é via bloqueio dos canais de cálcio.

Os íons cálcio são conhecidos por estarem envolvidos na regulação de vários processos biológicos. Trocas transitórias na concentração de cálcio citoplasmático representam a chave da neurotransmissão e a modulação da excitação de membranas celulares. Assim, evidências têm mostrado o envolvimento do íon cálcio na nocicepção, incluindo efeitos analgésicos produzidos por opióides. A combinação de opióides como drogas para interferir com íons cálcio em neurônios tem sido apontado como uma ferramenta importante. Alternativamente, drogas que reduzem o fluxo de íons cálcio em neurônios têm sido indicados como analgésicos alternativos. Um potente bloqueador dos canais de cálcio é o verapamil, o qual bloqueia este canal ao impedir sua abertura. Esta substância afeta principalmente o músculo liso e cardíaco, inibindo a entrada de  $Ca^{++}$  causada por despolarização (WEISSMAN et al., 1999).

Desta forma, evidências têm se acumulado a cerca da propriedade de agonistas opióides por modificarem a excitabilidade membranar e a sinalização celular por modificação direta ou indireta do fluxo transmembrana de íons cálcio (PRADO et al., 2001).

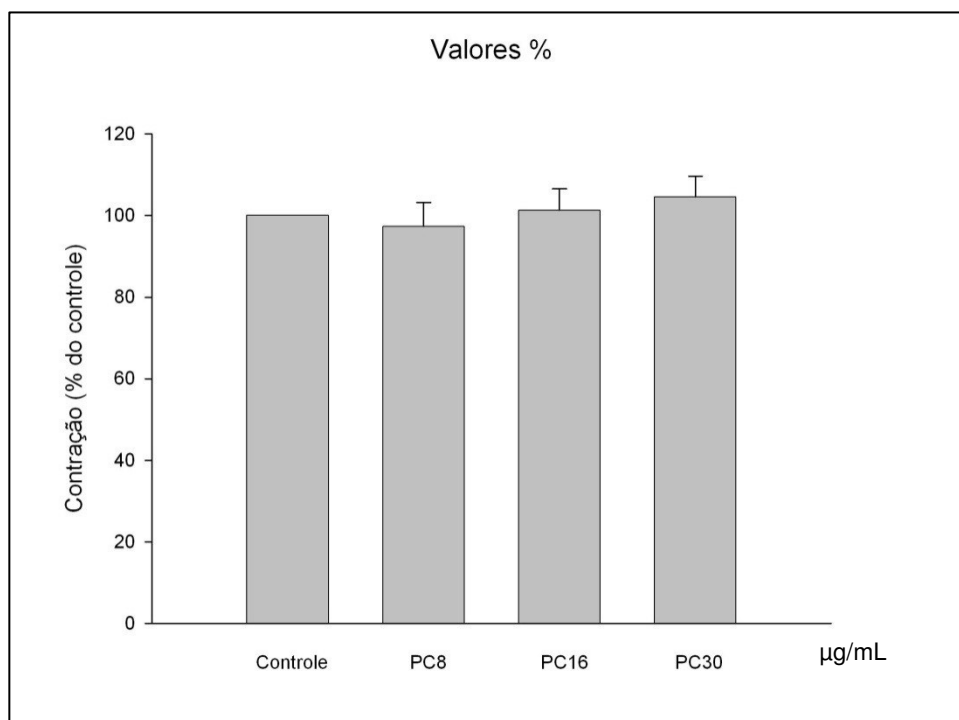


FIGURA 15 - Efeito da Pc sobre a contratilidade duodenal *in vitro*. As barras representam os percentuais % de contração após a adição crescente e cumulativa das concentrações de lectina (8, 16 e 30 µg/mL) em relação ao controle.

## 6.5 Estudo da Atividade Antiinflamatória

### 6.5.1 Efeito da Pc sobre a Migração de Neutrófilos em Cavidade Peritoneal Induzida por Carragenana

Como a Pc apresentou efeitos antinociceptivos, agindo de forma satisfatória na fase inflamatória (2<sup>a</sup> fase do teste da formalina), tornou-se necessário a realização de um estudo mais aprofundado de sua ação antiinflamatória. A Pc (8,1 mg/kg, i.v) quando administrada 30 min antes da administração i.p do agente inflamatório carragenana (500 µg/1,0 mL), foi capaz de diminuir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal do rato ( $1,91 \pm 0,17 \times 10^6$  neutrófilos por mL do lavado peritoneal) em 84% (FIGURA 16). O efeito inibidor da migração de neutrófilos da Pc foi inferior ao observado para a administração prévia do controle positivo dexametasona ( $2,88 \pm 0,30 \times 10^6$  neutrófilos por mL do lavado peritoneal) a uma concentração mais baixa (1 mg/kg, s.c). Neste estudo, sugere-se que o pré-tratamento dos ratos com Pc atenuou a interação leucócito-endotélio (rolamento e adesão) e a transmigração neutrofílica em resposta a injeção do estímulo inflamatório. Na literatura, dentre os estudos de atividades antinociceptiva e antiinflamatória realizados com lectinas purificadas de algas marinhas, a Pc foi a única que mostrou-se capaz de reduzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal.

O efeito inflamatório da carragenana envolve a ação de uma série de mediadores, com a liberação inicial de histamina, serotonina e bradicinina, seguida pelo aumento nos níveis de prostaglandinas que coincide por sua vez, com a migração de leucócitos, os quais amplificam a resposta inflamatória na medida em que desencadeiam a produção de outros mediadores (NANTEL et al., 1999)

A especificidade molecular dos leucócitos tendo como alvo os locais de inflamação é mediada pelas lectinas de membranas, selectinas, integrinas, e imunoglobulinas, que devido à correlação destas com os mecanismos de interação

e adesividade entre diversas moléculas, leucócitos e células endoteliais, são conhecidas como moléculas de adesão (SIMON & GREEN, 2005).

Outras lectinas também têm apresentado diminuição na migração de leucócitos e efeito nociceptivo pela inibição da produção de citocinas e quimiocinas e conseqüentemente a migração de neutrófilos, tal como a lectina de *Lonchocarpus sericeus* (NAPIMONGA et al., 2007) e a lectina da semente de *Vatairea macrocarpa*, as quais inibiram de maneira significativa e dose-dependente a migração de neutrófilos (ALENCAR et al., 2003).

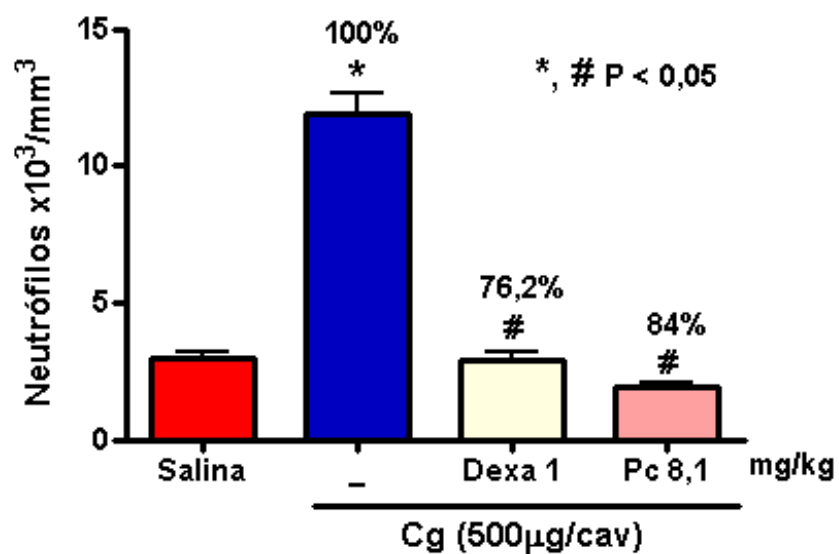


FIGURA 16 - Efeito da Pc sobre a migração de leucócitos induzida por carragenana. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do número de leucócitos. \* $p < 0,05$  indica diferença estatística comparado ao grupo salina e # $p < 0,05$  comparado com o grupo Cg. (ANOVA; Bonferroni).



### 6.5.2 Efeito da Pc sobre o Edema de Pata Induzido por Carragenana

A Pc na dose de 8,1 mg/kg foi administrada por via i.v, no intuito de observar seu possível efeito sobre o edema de pata induzido por carragenana em ratos e como controle positivo, utilizou-se dexametasona (Dexa). Observou-se que a Pc na dose utilizada, não foi capaz de inibir o edema de forma significativa, atuando de forma fraca nas primeiras duas horas, quando comparado ao controle dexametasona (FIGURA 17). A Pc provavelmente deva atuar no início da migração inibindo as selectinas e integrinas, impedindo a aderência e a rolagem do neutrófilo, já que não teve efeito na diminuição da permeabilidade celular.

Estudo recente caracterizou o edema de carragenana, numa fase inicial (1-6h) e tardia (12-24h). A primeira fase foi associada com o aumento nos níveis de prostaglandinas  $E_2$  ( $PGE_2$ ) e tromboxano  $B_2$  e com a expressão acentuada da  $PGE_2$  sintase precedida pela expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) (GUAY et al., 2004).

O edema de pata induzido pela injeção de carragenina, em ratos, está associado com a produção de diferentes mediadores inflamatórios, incluindo, histamina, serotonina, bradicininas, óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, cuja liberação é intimamente associada à migração de leucócitos para o sítio inflamatório (HAJARE et al., 2001).

O resultado obtido com a administração da Pc, diferiu dos resultados encontrados com o uso de lectinas ligantes de manose isoladas de sementes brasileiras (ASSREUY et al., 1997) e de lectinas de leguminosas que apresentaram efeito significativo na redução do edema (ALENCAR et al., 1999).

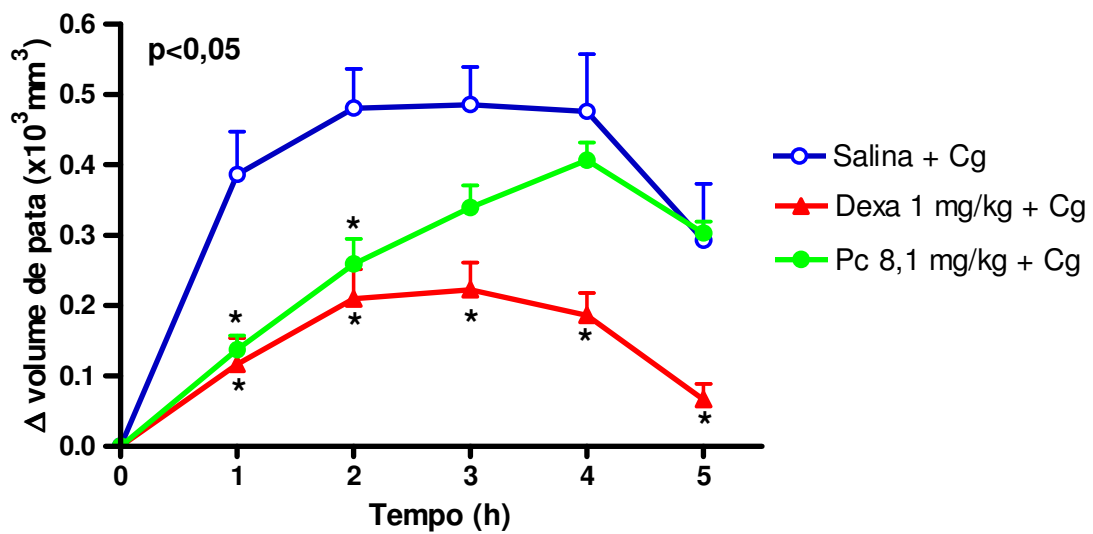


FIGURA 17 - Variação do volume de pata induzido por carragenana. Inicialmente os animais (6/ grupo) receberam 30 min antes da injeção de Cg (500  $\mu\text{g}$ /pata): Pc 8,1 mg/kg; i.v, dexametasona (1 mg/kg; s.c) ou salina (NaCl 0,15 M) (0,1 mL/10 g). Os pontos representam a média  $\pm$  E.P.M da variação do volume das patas ( $\text{mm}^3$ ). \* $p < 0,05$  indica diferença estatística comparado com o grupo controle salina (NaCl 0,15 M). (ANOVA, Bonferroni).

## 6.6 Avaliação da Toxicidade Aguda da Pc por Dose Repetida

A avaliação da toxicidade da lectina Pc na dose de 8,1 mg/kg; i.v mostrou que os animais não apresentaram alterações físicas como perda de pêlos ou peso. E para a verificação de alterações enzimáticas importantes presentes no plasma sanguíneo, antes do sacrifício, os animais tiveram seu sangue coletado. Observou-se através das análises bioquímicas pelas dosagens de enzimas, que a Pc não alterou de forma significativa as concentrações de Uréia, mostrando que ela não provoca possíveis alterações renais (FIGURA 18A). A dosagem de fosfatase alcalina apresentou uma pequena alteração a qual não foi significativa (FIGURA 18B), sendo uma enzima produzida em vários órgãos, incluindo ossos, fígado, intestino e normalmente encontrada no sangue de pessoas saudáveis. Resultado semelhante, sem alterações aparentes, também foram obtidos pelas dosagens das transaminases TGO e TGP (FIGURA 18C e D).

A enzima Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO) é uma das duas enzimas que catalizam a conversão da porção nitrogenada de um aminoácido para um resíduo de aminoácido, sendo essencial para a produção de energia no ciclo de krebs, podendo ser encontrada no citoplasma e mitocôndrias de muitas células, primariamente no fígado, coração, músculos esqueléticos, rins, pâncreas e hemácias. A outra transaminase (Transaminase Glutâmico Pirúvica) aparece, primariamente, em citoplasma hepatocelular, com quantidades menores nos rins, coração e músculos esqueléticos, sendo um indicador de comprometimento hepatocelular agudo.

Este ensaio consistiu também no acompanhamento da possível variação da massa corpórea (FIGURA 19A) e da pesagem dos órgão: rim e fígado para a verificação de alterações (FIGURA 19B). Assim, em nenhum desses parâmetro analisados, a Pc provocou alterações significantes, comprovando que a lectina de *P. capillacea* ao ser administrada ao longo dos dias de experimento, revelou-se atóxica, mostrando-se viável até a dose testada como um possível antiinflamatório a nível sistêmico.

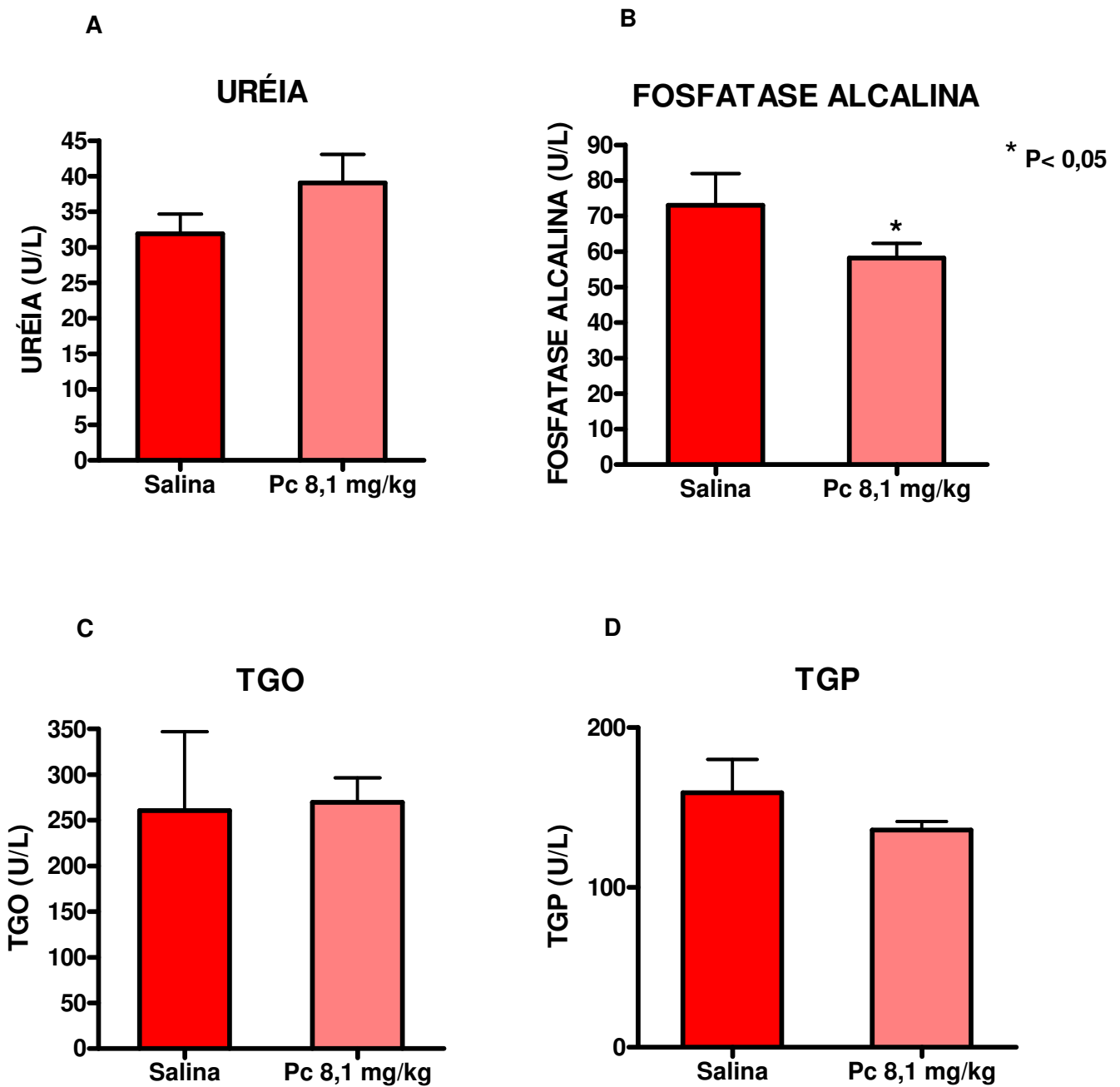


FIGURA 18 - Dosagem bioquímica de Uréia, Fosfatase Alcalina, TGO e TGP. Os planos A, B, C e D, representam a quantidade das enzimas por U/L. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M.  $*p < 0,05$  comparado ao grupo salina (NaCl 0,15 M). (ANOVA, Bonferroni)

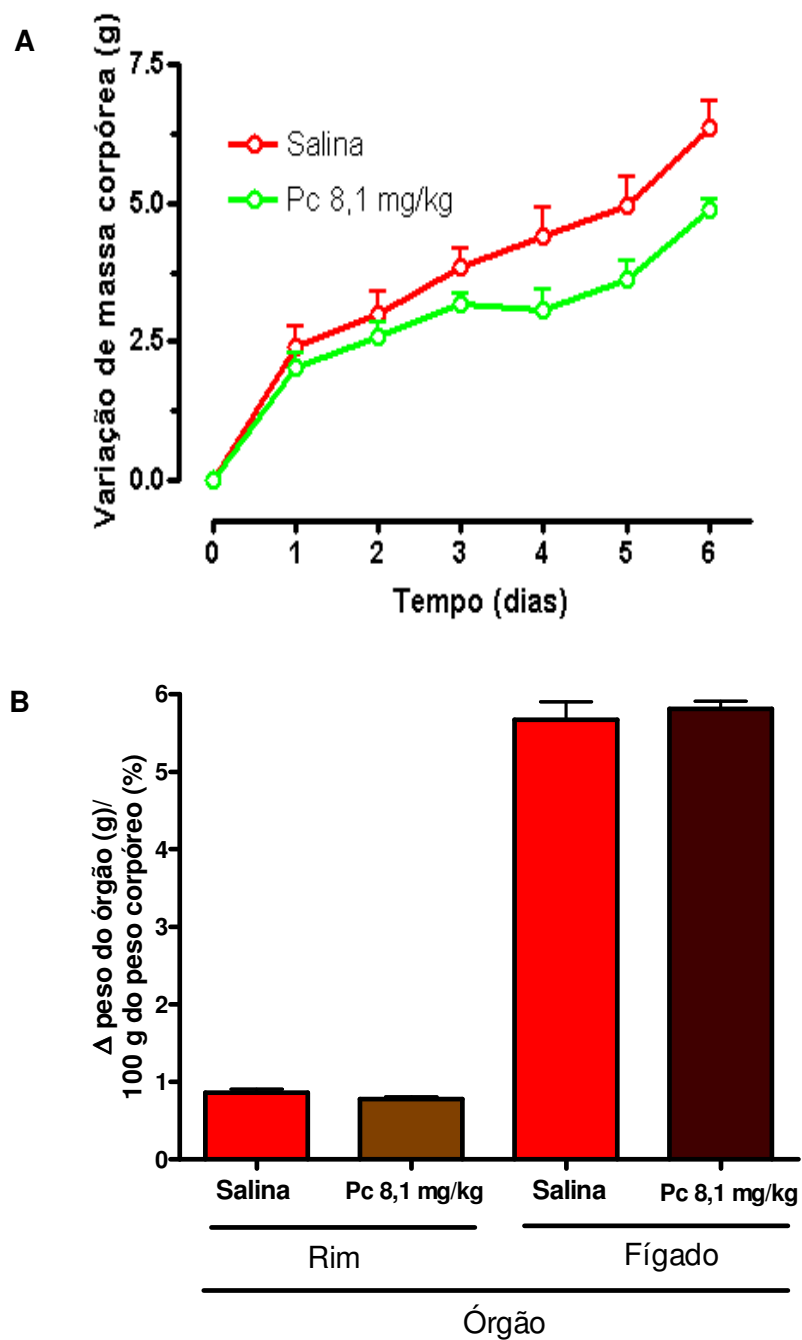


FIGURA 19 - Variação da relação de peso dos animais e dos órgão (rim e fígado) ao longo do ensaio para a verificação da toxicidade da Pc. Os planos A e B representam a variação do peso dos animais (8/grupo) e órgão ao longo de sete dias. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA, Bonferroni)

## 7. CONCLUSÕES

- A análise através da PAGE-SDS na presença ou ausência de agente redutor, mostrou que a lectina Pc apresenta uma única banda eletroforética de 36,1 KDa
- A Pc foi capaz de inibir de forma moderada a atividade nociceptiva em modelos clássicos de nocicepção possivelmente por inibição da liberação de mediadores inflamatórios
- Provavelmente, a proteína atue inibindo as selectinas, integrinas e/ou imunoglobulinas, impedindo a aderência e a rolagem de neutrófilos
- A Pc no ensaio toxicidade aguda por dose repetida, mostrou-se relativamente segura

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINOUZ, I. L. & SAMPAIO, A. H. Screening of brazilian marine algae for hemagglutinins. **Botanica Marina**, v. 34, p. 211-214, 1991.

AINOUZ, I. L., SAMPAIO, A. H., BENEVIDES, N. M. B., FREITAS A. P., COSTA, F. H. F., CARVALHO, M. R. & PINHEIRO-JOVENTINO, F. Agglutination of enzyme treated erithrocytes by brazilian marine algal extracts. **Botânica Marina**. v. 35, p. p. 475-479, 1992.

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. **Mediators of Inflammation**, v. 8, p. 107-113, 1999.

ALENCAR, N. M. N., ASSREUY, A. M. S, ALENCAR, V. B. M., 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. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 1674-1681, 2003.

ANDRADE, F. K. **Caracterização bioquímica e algumas propriedades farmacológicas da alga marinha vermelha *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh**. 120p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-Ceará, 2006.

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 of Inflammation**, v. 6, p. 201-210, 1997.

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

BENEVIDES, N. M. B., LEITE A. M. & FREITAS A. P. Atividade hemaglutinante na alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. **R. Bras. Fisiol. Veg**, v. 8, n. 2, p. 117-122, 1996.

BENEVIDES, N. M. B., OLIVEIRA, S. R. M., HOLANDA, M. L., MELO, F. R., FREITAS, A. L.P. and SAMPAIO, A. M. Seasonal variations in hemagglutinating activity and chemical composition of two red marine algae *Gracilaria dominigensis* and *Gelidium pusillum*. **R. Bras. Fisiol. Veg**, v.11, n 2, p. 91-95, 1999.

BENYHE, S. Morphine: new aspects in the study of an ancient compound. **Life Sci**, v. 55, p. 969-979, 1994.

BEVILACQUA, M. P., NELSON, R. M., MANNORI, G. *et al.* Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **Annu. Rev. Med.**, v. 45, p. 361- 378, 1994.



BIES, C., LEHR, C. M., WOODLEY, J. Lectin-mediated drug targeting: History and Applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 425-435, 2004.

BITENCOURT, F. S., FIGUEIREDO, J. G., MOTA, M. R. L., BEZERRA, C. C. R., SILVESTRE, P., VALE, M. R., NASCIMENTO, K. S., SAMPAIO, A. H., NAGANO, C. S., SAKER-SAMPAIO, S., FARIAS, W. R. L., CAVADA, B. S., ASSUREUY, A. M. S., ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 377, 139-148, 2008.

BLUNDEN, G. & ROGERS, D. J. Survey of british seaweeds for hemagglutinins. **Lloydia**, v. 38, n 2, p. 162-168, 1975.

BOYD, W. C., ALMODOVAR, L. R, BOYD, L. G. Agglutinins in marine algae for human erythrocytes. **Transfusion**, v. 6, p. 82-83, 1966.

BRAGGIO, M. M., LIMA, M. E. L., VEASEY, E. A., HARAGUCHI, M. Atividades farmacológicas das folhas de *Sesbania virgata* (CAV.) Pers. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 49-53, 2002.

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

BRITO, G. A., SARAIVA, S. N. R., FALCÃO, J. L. A. A., VALE, M. L., LIMA, A. A. M., CUNHA, F. Q., RIBEIRO, R. A. Dual effect of cAMP on the writhing response in mice. **Eur. J. Pharmacol**, v. 416, p. 223-230, 2001.

CARDOZO, K. H. M., GUARATINI, T., BARROS, M. P., FALCÃO, V. R., TONON, A.P., LOPES, N. P., CAMPOS, S., TORRES, M. A., SOUZA, A. O., COLEPICOLO., PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 146, p. 60-78, 2007.

CHOWDARY, K.P.R., RAO, Y.S. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. **Biol. Pharm. Bull**, v. 27, p. 1717-1724, 2004.

COLLIER, H. D. J., DINNIN, L. C., JOHNSON, C. A., SCHNEIDER, C. The abdominal response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol**, v. 32, p. 295 – 310, 1968.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. Robbins: **Patologia Estrutural e Funcional**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000, 168-176p.

DALTON, S. R., LONGLEY, R. E., BIRD, K. T. Hemagglutinins and immunomitogens from marine algae. **Journal of Marine Biotechnology**, v. 2, p. 149-155, 1995.

DI STASI, L.C. (org). **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996, 230p.

DUARTE, I. D., DOS SANTOS, I. R., LORENZETTI, B. B., et al. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol**, v. (2-3), p. 217-225, 1992.

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

EASON, K.E., ARONSTAM, R. S. Influence of sulfhydryl reagents on potassium-stimulated calcium uptake by rat brain synaptomes. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol**, v. 44, p. 503-506, 1984.

EDDY, N. B., LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. LI dithienylbutenyl and dithienylbutylamines, **J. Pharmacol. Exper., Ther**, v. 107, p. 385-393, 1953.

FAMAHEY, J. P. In vitro and in vivo pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide: An overview. **Inflamm. Res**. V. 46, p. 437- 446, 1997.

FARIAS, M. R., SIMÕES C. M. O., RECH, N., BOFF, P.R., STORB, B. H., ROVARIS, D. A. **Espécies vegeyais empregadas na produção de fitoterápicos em Santa Catarina. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 12, 125p. 1994, Fortaleza. Anais.

FARSAM, H., AMANLOU, M., DEPOUR, AR., JAHANIANI, F. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. Root extract. **J. Ethnopharmacol**, v. 71, p. 443-447, 2000.

FERREIRA, S. H., LORENZETTI, B. B., DE CAMPOS, D. I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain**, 42(3), p. 365, 1990.

FORSTNER, J. F., FORSTNER, G. G. Gastrointestinal mucus. In: JOHNSON, L. R. (Ed), **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. Raven Press, NY 1994

FREITAS, A. L. P., TEIXEIRA, D. I. A., COSTA, F. H. F., FARIAS, W. R. L., LOBATO, A. S. C., SAMPAIO, A. H., BENEVIDES, N. M. B. A new survey of brazilian marine algae for agglutinins. **Journal of applied phycology**, v. 9, p. 495-501, 1997.

FRÜST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain, res. Bull**, v. 48, p. 129-141, 1999.

FUCHS, F. D. E., WANNAMACHER, L. em: **Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional**. 2ª Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1998.

GRUBB, B. D. Peripheral and central mechanism of pain. **Br. J. Anaesth**, 1998, 81p.

GUAY, J., BATEMAN, K., GORDON, R., MANCINI, J., RIENDEAU, D. Carrageenen-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE<sub>2</sub> synthase-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 24866-72, 2004.

GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Guanabara Koogan, 10<sup>a</sup> ed. São Paulo, 2002. 973pp.

HAJARE, S. W., CHANDRA, S., CHARMA, J., TANDAN, S. K., LAL, J., TELANG, A. G. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia sissoo* leaves. **Fitoterapia**, v. 72, p. 131-139, 2001.

HAMES, B. D. AND D. RICKWOOD. **Gel electrophoresis of proteins. A Practical Approach**. IRL Press, Washington, pp. 287, 1983.

HAMPTON, M. B., KETTLE, A. J., WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, n.9, p. 3007- 3017, 1998.

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

HOLANDA, M.L., MELO, V. M. M., SILVA, L. M. C. M., AMORIM, R. C. N., PEREIRA, M. G., BENEVIDES, N. M. B. Differential Activity of a Lectin From *Solieria filiformes* Against Human Pathogenic Bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p. 1769-1773, 2005.

IKEDA, Y., UENO, A., NARABA, H., OH-ISHI. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci**, v. 69, p. 2911-2919, 2001.

JEPSON, M.A., CLARK, M.A., HIRST, B.H. M. cell targeting by lectins: a strategy for mucosal vaccination and drugs delivery. **Adv. Drug Deliv. Ver**, v. 56, p. 511-525, 2004.

JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. Histologia Básica. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004. 540p.

KAYSER, O., KIDERLEN, A. F., CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drug. **Parasitol Res**, v. 90, p.55-62, 2003.

KOSTER, R., ANDERSON, M., DE BEER, J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc**, v. 18, p. 412-417, 1959.

KUMMER, C. L., COELHO, T. C. R. B., Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs: current issues. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v. 52 (4), p. 498-512, 2002.

LE BARS. D., GOZARIU, M., CADDEN SW. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev.**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEITE, Y. F. M. M., SILVA, L. M. C. M., AMORIN, R. C. M., FREIRE, E. A., JORGE, D. M. M. J., GRANGEIRO, T.B., BENEVIDES, N. M. B. Purification of

lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 137-145, 2005.

LIAO, W. R., LIN, J. Y., SHIEH, W. Y., JEAG, W. L., HUANG, R. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **J. Ind. Microbiol Biotechnol**, v.30, p. 433 - 439, 2003.

LIMA . H.C., COSTA, F. H. F., SAMPAIO, A, A. H., NEVES, S, A., BENEVIDES, N. M. B., TEIXEIRA, D. I. A., ROGERS, D. J., FREITAS, A. L. Induction and inhibition of human lymphocyte transformation by the lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Journal of Applied Phycology**, v.10, p. 153-162, 1998.

LIMA, M. E. P., CARNEIRO, M. E., NASCIMENTO, A. E., GRANGEIRO, T. B., HOLANDA, M. L., AMORIM, R. C. N., BENEVIDES, N.M.B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J. agric. Food Chem**, v. 53, p. 6414-6419, 2005.

LIMA, V., SILVA, C. B., MAFEZOLI, J. BEZERRA, M. M., MORAES, M. O., MOURÃO, G. S. M. M., SILVA, J. N., OLIVEIRA, M. C. F. Antinociceptive activity of the pyranocoumarin seselin in mice. **Fitoterapia**,v. 77 p. 574-578, 2006.

LIS, H. & SHARON , N Lectins in higher plants. **The Biochemistry of Plants**, v.6, p. 371- 447, 1981.

MABEAU, S., CAVALOC, E., FLEURENCE, J., LA HAYE, M. New seaweed based ingredient for the food industry. **International Food Ingredient**, v. 3, p. 38 - 44, 1992.

MARCHIORO, M. BLANK, M. F. A., MOURÃO, R. H. V., ANTONIELLI, A. R. Antinociceptive activity of the aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves. **Fitoterapia**, v.6, p.637- 642, 2005.

MELO, F. R., BENEVIDES, N. M. B., PEREIRA, M. G., HOLANDA, M. L., MENDES, F. N. P., OLIVEIRA, S. R. M., FREITAS, A. L. P., SILVA, L. M. C. M. Purification and partial characterization of a lectin from the red marine alga *Vidalia obtusiloba* C. Agardl. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 263-269, 2004.

MINÕ, J., MOSCATELLI, V., HNATYSZYN, O., GORZALCZANE, S., ACEVEDO, C., FERRARO, G. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Artemisia copa* extracts. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 50-63, 2003.

MEOTTI, F. C., FACHINETTO, R., MAFFI, L. C., MISSAU, F. C., PIZZOLATTI, M. G., ROCHA, J. B. T., SANTOS, A. R. S. Antinociceptive action of myricitrin: Involvement of the K<sup>+</sup> and Ca<sup>++</sup> channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 567, p. 198-205, 2007.

MOE, S. T. Alginates. In: STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharides and their Applications**. New York: Marcel Dekker. Inc., p. 245-286, 1995.

NANTEL, F., DENNIS, D., GORDON, R., NORTHEY, A., CIRINO, M., METTERS, K. M., CHAN, C.C., Distribution and regulation of



cyclooxygenases-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal Pharmacology**, v. 128, p. 853-850, 1999.

NAKAMURA, M., FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol**, v. 2, p. 135 - 145, 1987.

NAPIMOGA, M. H., CAVADA, B. S., ALENCAR, M. L. M., BITTENCOURT, F. S., ALVES FILHO, J. C. GRESPAN, R., GONÇALVES, R. G., 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**, v. 7, p. 824 - 835, 2007.

NASCIMENTO, A. E. **Efeitos tóxicos de lectina e toxina da alga marinha *Soliéria filiformes* sobre camundongos e *Boophilos microplus* (carrapatos)**. 130 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-Ceará, 2003.

NATHAN, C. **Points of control in inflammation**. *Nature*, v. 420, p. 846-852, 2002.

NELSON, DAVID. L., COX, MICHAEL , M., **Lenhinger Princípios de Bioquímica**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo. Savier, p. 975, 2002.

NEVES, S, A., DIAS-BARUFFI., FREITAS, A. L. P., ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophil migration induced *in vivo* and *in vitro* marine algal lectins. **Inflamm. Res.** v 50, p.486-490, 2001.

NEVES, S. A., FREITAS, A. L. P., SOUZA, B. W. S., ROCHA, M. L. A., CORREIA, M. V. O., SAMPAIO, D. A., VIANA, G. S. B. Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Brasilian Journal of Medical and Biological research**, v. 40, p. 127-134, 2007.

OLIVEIRA, S. R. M., NASCIMENTO, A. E., LIMA, M. E. P., LEITE, Y. F. M. M., BENEVIDES, N. M. B. Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* Santel & Hommers. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 397- 403, 2002.

PANE, J., PERRY, M., GRANGER, D. N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br. J. Pharmacol**, v. 126, p. 537- 550, 1999.

PICOLO, G., GIORGI, R., CURY, Y.  $\delta$ - Opioid receptor nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus* terrificus snake venom. **European Journal Pharmac**, v. 391, p. 55 - 62, 2000.

PICULELL, L. Gelling Carrageenans. In: STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharides and their Applications**. New York: Marcel Dekker. Inc., p. 204 - 244, 1995.

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, W. J. N. Lectin as plant defense proteins. **Plant Physiology. Belgium**, v.109, p. 347- 352, 1995.

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, W. J. N. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. In **Biothecnology and Genetic Enginnerring Reviews**, v 15, p. 199 - 228, 1998.

PRADO, W. A. Involvement of calcium in pain and antinocicepção. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 449 - 461, 2001.

QUEIROZ, A. F. S., MOURA, R. M. RIBEIRO, J. K. C., LYRA, I. L., CUNHA, D. C. S., SANTOS, E. A., de-SALES, M. P. Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 147, p. 216 - 221, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. **Farmacologia** , 6<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Elsevier. 2007, 920 pp.

RAVEN P.H., EVERT, R. F. & EICHHOM, S. E. **Biologia vegetal** Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 6: 906 pp., 2001.

RIBEIRO, R. A., VALE, M. L., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur. J. Pharmacol.** **391**: 97-103, 2000.

ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S., KUMAR, V. Pathologic basic of diseases. Philadelphia: **W. B. Saunders**, 1994, 1400 p.

ROGERS, D. J., FISH, B. & BARWELL, C. J. Isolation and properties of lectin from two red marine algae: *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. In J. Kocourek & D. L. J. FREUD, (Eds). Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Proceedings of the 10th Lectin Meeting. **Sigma Chemical Company**, v. 7, p. 49 - 52, 1991.

ROGERS, D. J. & HORI, K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobiologia**, v. 260 - 261, p. 589-593, 1993.

ROGERS D. J., LOVELESS, R. W., BALDING P. Isolation and characterization of the lectins from Sub-species from *Codium fragile*. **Lectins**. v. 5, p. 155 - 160, 1986.

ROCHA, M. L. A. Uso das lectinas de algas marinhas no diagnóstico de diabetes mellitus e em ensaios farmacológicos. 113f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-Ceará, 2006 .

RUDIGER, H., GABIUS, H.J. Plants lectins: occurrence, biochemistry, functions and application. **Glycoconj. J.** v. 18, p. 589 - 613, 2001.

SANTOS, A. R., VEDANA, E.M., DE FREITAS, G. A. Antinociceptive effect of meloxicam in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research** 47, 302 - 307, 1998.

SHARON, N. & LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v.246, p. 227- 234, 1989.

SILVA, N. S. F., SAKATA, R. K., ISSY, A. M. Effects of different spinal morphine doses in rats. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v. 54(1), p. 60 - 67, 2004.

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

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology** v. 16, p. 245 - 262, 2004.

SOUZA, G. E. P., FERREIRA, S. H. Blockade antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Ag. Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

STANLEY, N. Agars. In: STEHEN, A. M. **Food Polysaccharides and their Applications**. New York: Marcel Dekker. Inc., p. 187- 204, 1995.

STEPHANO, J.L., M. AND I. ROJAS-GALICIA. Advantages of picrate fixation for staining polypeptides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochem**, v. 152, p. 308 - 313, 1986.

STERANKA, L. R., MANNING, D. C., DEHAAS, C. J., FERKANY, J. W., BOROSKY, S. A., O'CONNOR, J. R., VAVREK, R. J., STEWART, J. M., SNYDER, C. H. Bradykinin as a pain mediator, receptors are localized to

sensory neurons, and antagonists has analgesic actions. **Procl. Natl. Acad. Sci. USA** , v. 85, p. 3245, 1988.

STITES, D. P., TERR, A. J. **Imunologia Básica**. Tradução José Mauro Peralta, Lúcia Martins Teixeira, Alexandre Januário da Silva. Rio de Janeiro: Editora Prentice-Hall do Brasil LTDA, 1992. 102-117p.

TAIWO, Y. O., LEVINE, J. D. Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradykinin and noradrenaline hyperalgesia. **Brain Res.**, v. 458, p. 402, 1988.

TITA, B., HABDEL-HAQ., VITALONE, A., MAZZANTI, G., SASO, L. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. **I Farmaco**, v. 56, p. 341- 343, 2001.

VAN DRIESSCHE, E., FISCHER, J., BEECKEMANS, S., BOG-HANSE, T. C., Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. **Textop, Denmark**, v. 11,1996.

VIANA, G. S. B.; FREITAS, A. L. P.; LIMA, M.M. L.; VIEIRA, L. A. P.; ANDRADE, M. C. H.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetum* (S. G. Gmel) M. Howe. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 713 - 722, 2002.

VIEIRA, L. A. P., FREITAS, A. L. P., FEITOSA, J. P. A., SILVA, D. C., VIANA, G. S. B. The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Reseaech**, v. 37, p. 1071-1079, 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.

WANG, H., NG, T.B., OOI, V. E. C., LIU, W.K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** V. 32, 365 - 372, 2000.

WEISSMAN, R., GESTSLEV, V., PANKOVA, IA., SCHRIEBER, S., PICK, C. G. Pharmacological interaction of the calcium channel blockers verapamil and flunarizine with the opiod system. **Brain. Research,** v. 818, p. 187-195, 1999.

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