



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

TICIANA MONTEIRO ABREU

EFEITOS DA LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis* (Kützing)
P.W. Gabrielson NA NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO EM ANIMAIS

FORTALEZA

2012

TICIANA MONTEIRO ABREU

EFEITOS DA LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis* (Kützing)

P.W. Gabrielson NA NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO EM ANIMAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dra. Norma Maria Barros Benevides

Coorientadora: Prof.^a Dra. Érika Freitas Mota

FORTALEZA

2012

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)

- A99e Abreu, Ticiano Monteiro.
Efeitos da Lectina da Alga Marinha Vermelha Solieria filiformis (Kützing) P.W. Gabrielson na Nocicepção e Inflamação em Animais / Ticiano Monteiro Abreu. – 2012.
112 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.
1. Solieria filiformis. 2. Lectinas. 3. Nociceptividade. I. Título.

CDD 572

TICIANA MONTEIRO ABREU

EFEITOS DA LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis* (Kützing)
P.W. Gabrielson NA NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO EM ANIMAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 24/02/2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Érika Freitas Mota (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, fortaleza e suporte, em todos os momentos da minha vida.

À Prof^a. Norma Maria Barros Benevides pela acolhida, orientação, suporte, dedicação, apoio e, por muitas vezes, ouvir as minhas aflições sempre me dando ótimos conselhos.

À Prof^a. Érika Freitas Mota por ter aceitado me coorientar, pelos conselhos, apoio e ensinamentos ao longo do mestrado.

À Prof^a. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira, por gentilmente integrar a banca examinadora deste trabalho.

À Prof^a. Hellíada Chaves, por ter gentilmente me ajudado em alguns experimentos, e à Prof^a. Mirna M. Bezerra, pela atenção e hospitalidade no laboratório.

A todos do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (Carbolec): Alexia, Ana Luíza Quinderé, Ariévilo Rodrigues, Bruno Fontes, Chistiane Oliveira, Edfranck Vanderlei, Fabíula Moura, Felipe Barros, Gabriela de Paula, Gardênia Mendonça, Gerardo Carneiro, Ianna de Araújo, Ismael de Queiroz, Jane Silva, Luana Silva, Neto Silva, Ricardo Silva, Talita Mendes, Ticiania Lima, Willame da Silva e Ygor Eloy.

Um agradecimento especial à Natássia Ribeiro pelo apoio, amizade, esforço e companheirismo nos experimentos, apesar de algumas briguinhas.

À Prof^a. Márjory Holanda e ao Prof. Hermógenes de Oliveira, por gentilmente cederem o espaço do laboratório para a realização de experimentos.

Ao Prof. José Tadeu de Oliveira, por ter cedido o seu laboratório, e à Darcy Gondim e Fredy Silva, por tão prontamente terem me auxiliado na realização de experimentos.

À Prof^a. Ilka Vasconcelos por ter gentilmente realizado o sequenciamento da proteína utilizada nesse trabalho.

À Roberta Jeane Bezerra Jorge pelo valioso auxílio nas análises histológicas.

À Trycia Magalhães e Gabrielle de Freitas, por terem me recebido na sua casa em Sobral, quando estive nessa cidade para a realização de experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, por terem contribuído com o meu crescimento estudantil, profissional e pessoal.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, principalmente, da minha turma de mestrado, pelo apoio e companheirismo, e, à Marina Lobo, pelas partilhas e disposição para ajudar.

A todos os meus amigos da Obra Bene Ha Iahweh Hain, principalmente dos grupos Guiados pela Misericórdia e São José, por serem verdadeiros irmãos e sempre torcerem muito pelos meus projetos.

Aos amigos Camila Carvalho, Saulo Victor, Iara Rebouças, Raphael Aleixo, Gleyciane Nobre, Bruno Barbosa e Fabíola e Leandro Damasceno, por terem me apoiado bastante no ano de 2011 e se revelado amigos valiosos que desejo que estejam sempre presentes na minha vida.

Ao Dante Gadelha, por fazer parte da minha vida, pelo seu amor, compreensão, apoio e paciência incondicionais.

Em especial, aos meus pais, Filomeno e Zilmar, pela torcida, paciência e amor incondicional; aos meus irmãos, Vlândia, Filomeno e Juliana, pelo carinho e apoio, em todos os momentos; e a todos os meus familiares.

À Universidade Federal do Ceará (UFC); ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio e custeio de projetos desenvolvidos no Carbolec; também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pelo custeio de projetos desenvolvidos no Carbolec.

RESUMO

As algas marinhas são fontes de compostos bioativos, os quais vêm despertando interesse em aplicações farmacológicas. Dentre esses, destacam-se as lectinas, que são (glico)proteínas que se ligam a mono ou oligossacarídeos específicos. O objetivo desse trabalho foi isolar a lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (LSf), investigar as suas propriedades na nocicepção e na inflamação aguda e seus possíveis sinais de toxicidade em animais. Inicialmente, a LSf foi purificada por extração com tampão Tris-HCl 25mM, pH 7,5, precipitação com sulfato de amônio (70%) e cromatografias em colunas de DEAE-celulose e Sephadex G-100. Na avaliação das atividades biológicas, grupos de animais (n=6) foram submetidos ao pré-tratamento com a LSf (1, 3 ou 9 mg/kg; i.v.), 30 min antes do estímulo nociceptivo ou inflamatório. A atividade antinociceptiva foi avaliada em camundongos *Swiss* machos através dos ensaios de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8%, teste da formalina a 2% e da placa quente. Morfina e indometacina (5 mg/kg; s.c.) foram utilizadas como controles. A atividade anti-inflamatória em ratos *Wistar* machos foi avaliada através dos ensaios de peritonite induzida por carragenana - Cg (700 µg/cav) e de edema de pata induzidos por Cg (700 µg/pata); dextrano (500 µg/pata); ou pela própria LSf (9 mg/kg). Dexametasona (1 mg/kg; s.c.) foi utilizada como controle. A ação edematogênica da LSf (1, 3 ou 9 mg/kg) foi avaliada através da sua aplicação na pata de ratos e da modulação farmacológica do edema formado. O estudo da toxicidade da LSf (9 mg/kg;i.v.) foi realizado através da sua aplicação em camundongos (7 dias) e da análise dos parâmetros físicos, bioquímicos e histológicos. A LSf reduziu significativamente o número de contorções abdominais e o tempo de lambertura da pata na segunda fase do teste da formalina, porém não prolongou o tempo de reação na placa quente. A LSf também inibiu a migração celular na peritonite induzida por Cg e os edemas de pata induzidos por Cg, dextrano e LSf. Ademais, LSf apresentou atividade edematogênica, que foi inibida por indometacina e dexametasona. Adicionalmente, a administração da LSf por 7 dias não apresentou sinais de danos sistêmicos, exceto pela redução no nível de fosfatase alcalina e esplenomegalia. Concluindo, a LSf possui propriedades antinociceptiva, anti-inflamatória (i.v.) e edematogênica (i.pl.), podendo representar um potencial agente terapêutico e uma possível ferramenta para o estudo da inflamação.

Palavras-chave: algas marinhas; *Solieria filiformis*; lectina; nocicepção; inflamação.

ABSTRACT

The seaweeds are a source of bioactive compounds, which gained importance in pharmacological applications. Among these, there are the lectins, which are (glyco)proteins that bind to specific mono or oligosaccharides. The aim of this study was to isolate the lectin from the red seaweed *Solieria filiformis* (LSf), investigate its properties in acute nociception and inflammation, and their possible signs of toxicity in animals. Initially, the LSf was purified by extraction with Tris-HCl buffer 25 mM (pH 7,5), precipitation with ammonium sulfate (70%) and chromatographies in DEAE-cellulose and Sephadex G-100 columns. In the evaluation of the biological activities, animals groups (n=6) were submitted to pretreatment with LSf (1, 3 or 9 mg/kg; i.v.), 30 min before of the nociceptive or inflammatory stimulus. The antinociceptive activity was evaluated in male mice *Swiss* using the abdominal writhing test induced by acetic acid 0,8%, the formalin test to 2% and the hot plate test. Morphine and indomethacin (5 mg/kg; s.c.) were used as controls. The anti-inflammatory activity in male rats *Wistar* was assayed through of the peritonitis induced by carrageenan - Cg (700 µg/cav) and of the paw edemas Cg- (700 µg/paw), dextran- (500 µg/paw) or LSf-induced (9 mg/kg) models. Dexamethasone (1 mg/kg; s.c.) was used as control. The LSf edematogenic action (1, 3 or 9 mg/kg) was evaluated by the application of this lectin in the rat paws and by the pharmacological modulation of the edema formed. The toxicity study of LSf (9 mg/kg; i.v.) was carried out through of its application in mice (7 days) and of the analysis of the physical, biochemical and histological parameters. LSf significantly reduced the number of abdominal writhing and the paw licking time in the second phase of formalin test, but didn't prolong the reaction time in hot plate test. The LSf also inhibited the cell migration in peritonitis induced by Cg and the paw edemas induced by Cg, dextran and LSf. Moreover, LSf showed edematogenic activity, which was inhibited by indomethacin and dexamethasone. Additionally, the LSf administration for 7 days presented no signs of systemic damages, except for the reduced level of alkaline phosphatase and splenomegaly. Concluding, the LSf has antinociceptive, anti-inflammatory (i.v.) and edematogenic (i.pl.) properties and could represent a potential therapeutic agent and a possible tool for the inflammation study.

Keywords: seaweed; *Solieria filiformis*; lectin; nociception; inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Classificação Estrutural das Lectinas	19
Figura 2 -	O Caminho da Dor ao Cérebro	26
Figura 3 -	Sequência de Eventos Leucocitários na Inflamação	29
Figura 4 -	Alga Marinha Vermelha <i>Solieria filiformis</i> (Kützing) P.W. Gabrielson (Rhodophyta, Gigartinales, Solieriaceae)	42
Figura 5 -	Esquema de Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Vermelha <i>Solieria filiformis</i> (LSf)	46
Figura 6 -	Cromatografia de Troca Iônica em Gel de DEAE-celulose com F0/70 de <i>S. filiformis</i>	59
Figura 7 -	Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100 com PI-DEAE de <i>S. filiformis</i>	59
Figura 8 -	PAGE-SDS das Frações PI-DEAE e PII-Sephadex da Alga Marinha Vermelha <i>S. filiformis</i> .	61
Figura 9 -	Eletroforese Bidimensional da Lectina da Alga Marinha Vermelha <i>S.</i> <i>filiformis</i>	62
Figura 10 -	Alinhamentos Encontrados para a Sequência NH ₂ -terminal da LSf	64
Figura 11 -	Alinhamento do NH ₂ -terminal da LSf com o NH ₂ -terminal da Lectina da <i>E. serra</i>	64
Figura 12 -	Efeito da LSf no Modelo de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético em Camundongos	66
Figura 13 -	Efeito da LSf Desnaturada ou Associada com Manana no Modelo de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético em Camundongos	67
Figura 14 -	Efeito da LSf no Teste da Formalina a 2%	69
Figura 15 -	Efeito da LSf Desnaturada ou Associada com Manana no Teste da Formalina a 2% em Camundongos	70
Figura 16 -	Efeito da LSf no Teste da Placa Quente em Camundongos	72
Figura 17 -	Efeito da LSf sobre a Migração de Leucócitos Totais Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Ratos	74

Figura 18 -	Efeito da LSf sobre a Migração de Neutrófilos Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Ratos	75
Figura 19 -	Atividade da Mieloperoxidase (MPO) nos Líquidos Peritoneais Coletados no Ensaio de Migração Celular	76
Figura 20 -	Efeito da LSf Desnaturada ou Associada com o Ligante Manana sobre a Migração de Leucócitos Totais Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Ratos	77
Figura 21 -	Efeito da LSf Desnaturada ou Associada com o Ligante Manana sobre a Migração de Neutrófilos Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Ratos	77
Figura 22 -	Efeito da LSf Desnaturada ou Associada com o Ligante Manana sobre a Migração Celular Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Ratos	79
Figura 23 -	Atividade da Mieloperoxidase (MPO) no Sobrenadante do Homogenato das Secções das Patas	80
Figura 24 -	Efeito da Lectina Desnaturada ou Associada ao seu Ligante Manana sobre o Edema de Pata Induzido por Cg	81
Figura 25 -	Análise do Envolvimento da Via da Hemoxigenase (HO-1) na Atividade Anti-inflamatória da LSf	83
Figura 26 -	Efeito da LSf sobre o Edema de Pata Induzido por Dextrano em Ratos	85
Figura 27 -	Ensaio de Edema de Pata Induzido por LSf em Ratos	88
Figura 28 -	Atividade da Mieloperoxidase (MPO) no Sobrenadante dos Homogenatos das Secções das Patas do Ensaio de Edema de Pata Induzido por LSf	89
Figura 29 -	Modulação Farmacológica da Atividade Edematogênica da LSf em Ratos	90
Figura 30 -	Avaliação do Efeito da LSf sobre o Edema de Pata Induzido pela LSf em Ratos	92
Figura 31 -	Análises Histológicas dos Órgãos Retirados dos Camundongos Utilizados no Ensaio de Toxicidade por Dose Repetida (7 dias)	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Purificação da Lectina da Alga Marinha Vermelha <i>Solieria filiformis</i> (LSf)	60
Tabela 2 - Ensaio de Edema de Pata Induzido por LSf em Ratos	87
Tabela 3 - Análises Bioquímicas e dos Pesos Corporal e dos Órgãos de Camundongos Submetidos ao Tratamento com LSf (i.v.) por 7 Dias	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A ₂₈₀	Absorbância a 280 nm
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina sérica bovina
BVD	Biliverdina
° C	Grau centígrado
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
Cg	Carragenana
CO	Monóxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
DEAE	Dietilaminoetil
Dexa	Dexametasona
DTT	Ditiotreitol
E. P. M.	Erro padrão da média
F0/70	Fração protéica precipitada com sulfato de amônio a 70% de saturação
fMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanina
g	grama
h	hora
ha	hectare
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
HO	Hemoxigenase
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
ICAMs	Imunoglobulinas de adesão
IEF	Focalização isoeletrica
IL	Interleucina

Ind	Indometacina
iNOS	“Inducible nitric oxide synthase” - Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.v.	Intravenosa
kDa	Quilodáltons
LSf	Lectina da alga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i>
LSfd	LSf desnaturada
LT	Leucotrieno
µg	Micrograma
µL	Microlitro
m	Metro
M	Molar
Man	Manana
MPO	Mieloperoxidase
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
MM	Massa molecular
Mor	Morfina
n°	Número
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information -
NGF	Fator de crescimento nervoso
NH ₂ -Terminal	Aminoterminal
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NT	Não tratado
PAF	Fator de ativação plaquetário
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

PG	Prostaglandina
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>pI</i>	Ponto isoelétrico
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
s	Segundos
s.c.	Subcutânea
SDS	Dodecil sulfato de sódio
S.P.	Substância P
TB	Tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5
TEMED	N,N,N',N' - Tetrametiletlenodiamino
TNF	Fator de necrose tumoral
UI	Unidade Internacional
UH	Unidade hemaglutinante
ZnPP	Zinco protoporfirina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Algas Marinhas	17
1.2	Lectinas	18
<i>1.2.1</i>	<i>Lectinas de Algas Marinhas</i>	20
1.3	Isolamento e Purificação de Lectinas de Algas Marinhas	21
<i>1.3.1</i>	<i>Lectina da Alga Marinha Vermelha Solieria filiformis</i>	22
1.4	Aplicações e Atividades Biológicas de Lectinas de Algas Marinhas	23
1.5	Dor e Nocicepção	24
1.6	Inflamação	27
<i>1.6.1</i>	<i>Principais Células Envolvidas no Processo Inflamatório</i>	28
<i>1.6.2</i>	<i>Principais Mediadores Envolvidos na Inflamação</i>	32
<i>1.6.2.1</i>	<i>Via da Hemoxigenase</i>	35
1.7	Fármacos Utilizados no Controle da Dor e Inflamação	36
2	OBJETIVOS	40
2.1	Geral	40
2.2	Específicos	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	Materiais	41
<i>3.1.1</i>	<i>Alga Marinha</i>	41
<i>3.1.2</i>	<i>Células Sanguíneas</i>	41
<i>3.1.3</i>	<i>Animais</i>	41
<i>3.1.4</i>	<i>Fármacos e Reagentes</i>	43
3.2	Métodos	43
<i>3.2.1</i>	<i>Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Vermelha Solieria filiformis</i>	43
<i>3.2.1.1</i>	<i>Preparação do Extrato Total</i>	44
<i>3.2.1.2</i>	<i>Concentração Protéica por Precipitação com Sulfato de Amônio</i>	44
<i>3.2.1.3</i>	<i>Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose</i>	44
<i>3.2.1.4</i>	<i>Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100</i>	44

3.2.2	<i>Determinação do Teor de Proteínas Totais</i>	45
3.2.3	<i>Determinação da Atividade Hemaglutinante</i>	45
3.2.4	<i>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida</i>	47
3.2.5	<i>Eletroforese Bidimensional</i>	47
3.2.6	<i>Sequenciamento dos Aminoácidos da Extremidade Aminoterminal da LSf (NH₂-Terminal)</i>	48
3.2.7	<i>Avaliação do Efeito da LSf na Nocicepção em Camundongos</i>	48
3.2.7.1	<i>Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético</i>	49
3.2.7.2	<i>Teste da Formalina</i>	49
3.2.7.3	<i>Teste da Placa Quente</i>	50
3.2.8	<i>Avaliação do Efeito da LSf na Inflamação Aguda em Ratos</i>	50
3.2.8.1	<i>Atividade Antiinflamatória da LSf</i>	50
3.2.8.1.1	Ensaio de Migração Celular Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Ratos (Peritonite)	51
3.2.8.1.2	Ensaio de Edema de Pata Induzido por Carragenana	51
	a) Análise do Envolvimento da Via da Hemoxigenase (HO-1) na Atividade Anti-inflamatória da LSf	52
3.2.8.1.3	Ensaio de Edema de Pata Induzido por Dextrano	52
3.2.8.2	<i>Avaliação do Efeito Edematogênico da LSf</i>	53
3.2.8.2.1	Ensaio de Edema de Pata Induzido por LSf	53
3.2.8.2.2	Modulação Farmacológica da Atividade Edematogênica da LSf	53
3.2.8.2.3	Avaliação do Efeito da LSf (i.v.) sobre o Edema de Pata Induzido pela LSf (i.pl.)	54
3.2.8.3	<i>Determinação da Atividade da Mieloperoxidase (MPO)</i>	54
3.2.9	<i>Avaliação da Toxicidade por Dose Repetida em Camundongos</i>	55
3.2.9.1	<i>Análises Bioquímicas Enzimáticas do Plasma</i>	55
3.2.9.1.1	Dosagem de Uréia	55
3.2.9.1.2	Dosagem de Fosfatase Alcalina	56
3.2.9.1.3	Dosagens da Aspartato Aminotransferase (AST/TGO) e Alanina Aminotransferase (ALT/TGP)	56
3.2.9.2	<i>Análises Histológicas dos Órgãos</i>	57

3.2.10	<i>Análises Estatísticas</i>	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Purificação e Caracterização da Lectina da Alga Marinha Vermelha <i>Solieria filiformis</i>	58
4.1.1	<i>Purificação da Lectina</i>	58
4.1.2	<i>Eletroforeses Unidimensional e Bidimensional</i>	61
4.1.3	<i>Sequenciamento dos Aminoácidos da Extremidade Amino-terminal da</i> <i>LSf (NH₂-Terminal)</i>	63
4.2	Avaliação do Efeito da LSf na Nocicepção em Camundongos	65
4.2.1	<i>Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético</i>	65
4.2.2	<i>Teste da Formalina</i>	68
4.2.3	<i>Teste da Placa Quente</i>	71
4.3	Avaliação do Efeito da LSf na Inflamação Aguda em Ratos	73
4.3.1	<i>Atividade Antiinflamatória da LSf</i>	73
4.3.1.1	<i>Efeito da LSf sobre a Migração Celular Induzida por Carragenana (Cg) na</i> <i>Cavidade Peritoneal de Ratos</i>	73
4.3.1.2	<i>Ensaio de Edema de Pata Induzido por Carragenana em Ratos</i>	78
4.3.1.2.1	Análise do Envolvimento da Via da Hemoxigenase (HO-1) na Atividade Anti-inflamatória da LSf	82
4.3.1.3	<i>Ensaio de Edema de Pata Induzido por Dextrano (Dext)</i>	84
4.3.2	Avaliação do Efeito Edematogênico da LSf	86
4.3.2.1	<i>Ensaio de Edema de Pata Induzido por LSf</i>	87
4.3.2.2	<i>Modulação Farmacológica da Atividade Edematogênica da LSf</i>	89
4.3.2.3	<i>Avaliação do Efeito da LSf (i.v.) sobre o Edema de Pata Induzido pela LSf</i> <i>(i.pl.) em Ratos</i>	91
4.4	Avaliação da Toxicidade por Dose Repetida em Camundongos	93
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
6	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	100
	ANEXO	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas Marinhas

O termo "Alga" refere-se a uma grande variedade de organismos que são, na sua maioria, remotamente relacionados uns aos outros, sendo, então, um grupo polifilético, que possui representantes nos Domínios Eubacteria e Eukarya. Além disso, sendo produtores primários, as algas têm semelhantes funções biológicas e ecológicas com as plantas, mas não compartilham uma história evolutiva comum e sua bioquímica difere significativamente (STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

As algas estão dispostas em onze Divisões, segundo critérios químicos, citológicos e morfológicos, que estão relacionados aos tipos e às combinações de pigmentos fotossensibilizantes presentes; à natureza química das substâncias de reserva e das paredes celulares; à ausência ou à presença de flagelos; ao padrão e ao curso da mitose e da citocinese; à presença ou à ausência de membrana no retículo endoplasmático e ao tipo e à complexidade de ciclo de vida. Esses organismos variam bastante no tamanho, podendo apresentar de 3-10 μm como as algas unicelulares (microalgas) até mais de 70 m de comprimento como as gigantes *kelps* (macroalgas) e encontram-se distribuídos por diferentes habitats: oceanos, corpos de água doce, solos, rochas e superfície de vegetais (CARVALHO; ROQUE, 2000).

As algas marinhas representam a base da cadeia alimentar nos oceanos e são responsáveis por uma boa parte da atividade fotossintética global. Sua distribuição depende da temperatura e salinidade da água, da disponibilidade de luz solar, das correntes oceânicas e das condições físicas e químicas afins (EL GAMAL, 2010).

As macroalgas marinhas não são vascularizadas, contêm clorofila "a" e apresentam estruturas reprodutivas simples, isto é, sem a proteção de células estéreis. Do ponto de vista botânico, elas são classificadas de acordo com a estrutura física, função e ciclo reprodutivo em: Chlorophyta, que possui coloração verde, principalmente pela predominância das clorofilas a e b; Phaeophyta, com coloração marrom, principalmente pela presença dos pigmentos xantofila e fucoxantina; e Rhodophyta, que possui coloração vermelha devido à predominância dos pigmentos ficoeritrina e ficocianina. Esses grupos de algas adaptaram-se ao ambiente marinho através de diferentes vias evolucionárias, determinadas pelas informações genéticas existentes,

resultando em uma variedade de estratégias de sobrevivência, as quais influenciaram enormemente a sua morfologia, fisiologia e bioquímica (CARVALHO; ROQUE, 2000). Assim, a síntese de inúmeras classes de compostos bioativos, os quais estão normalmente envolvidos nos processos metabólicos (primário e secundário), são importantes para a defesa química desses organismos contra herbívoros (SZE, 1997).

Em muitos países, as algas são bastante utilizadas na indústria alimentícia e servem como fonte de fibras, minerais, vitaminas e diferentes antioxidantes. Além disso, podem oferecer inúmeros compostos químicos que têm revelado importantes resultados nas mais variadas aplicações biológicas e industriais (CARDOZO *et al.*, 2007). Dentre estes compostos, destacam-se as lectinas.

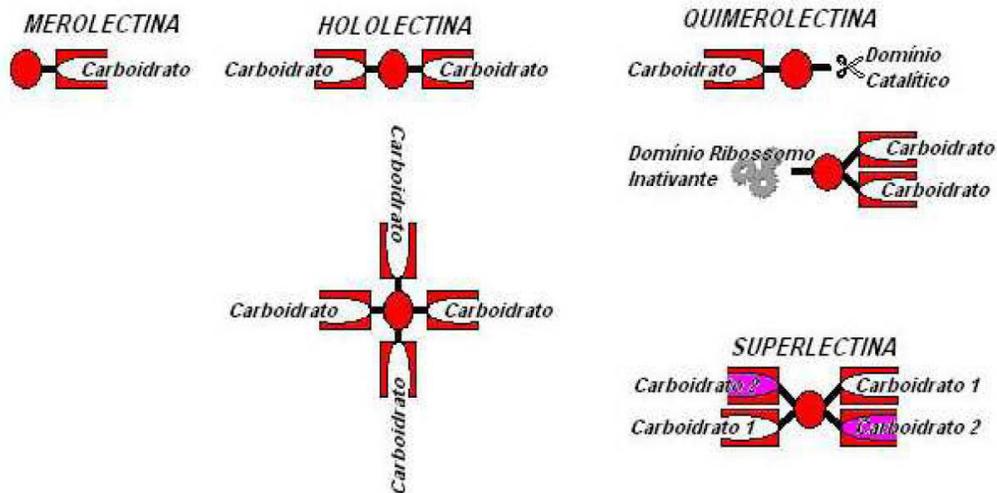
1.2 Lectinas

As lectinas possuem ampla distribuição na natureza e já foram encontradas em bactérias, fungos, algas, vegetais superiores, vertebrados, invertebrados e vírus (LIS; SHARON, 1981). A primeira definição dessas proteínas foi proposta por Boyd & Shapleigh (1954) os quais as definiram como proteínas que se ligam reversivelmente a carboidratos, aglutinando células e/ou precipitando polissacarídeos e glicoproteínas. Os autores utilizaram o termo “lectina” oriundo do latim *Legere*, que significa selecionar ou escolher, para definir uma classe de aglutininas de plantas superiores.

Posteriormente, várias definições e denominações foram propostas para essas moléculas. A mais utilizada foi proposta por Peumans & Van Damme (1995). De acordo com esses autores, lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune contendo pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. Essa ligação a resíduos de carboidratos pode ser de alta especificidade sem alterar a estrutura química dos ligantes (GRANGEIRO, 1996).

Tendo por base essa definição, Peumans & Van Damme (1995) subdividiram as lectinas em quatro grupos (FIGURA 1): merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

Figura 1 - Classificação Estrutural das Lectinas.



Fonte: Togashi, 2010. Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

Resumidamente, as merolectinas são as lectinas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidratos e, conseqüentemente, não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Como exemplo pode-se citar a heveína, uma proteína do látex de *Hevea brasiliensis*, com apenas um sítio ligante à quitina (VAN PARIJS; BROEKAERT; GOLDSTEIN, 1991).

Já as hololectinas consistem de, no mínimo, dois domínios idênticos ou bastante homólogos, que se ligam ao mesmo carboidrato ou a açúcares de estrutura similar e, portanto, são capazes de promover a aglutinação de células e/ou precipitar glicoconjugados. Tem-se como exemplo a maioria das lectinas conhecidas como hemaglutininas (CAVADA *et al.*, 2001).

Com relação às quimerolectinas, essas lectinas possuem, além de um ou mais domínios ligantes a carboidratos, outro domínio, apresentando atividade catalítica (ou outra atividade biológica), mas que age independentemente dos domínios ligantes a carboidratos. Como exemplo, cita-se a ricina, toxina da mamona, que é uma proteína inativadora do ribossomo (RIP), possuindo dois domínios de ligação para carboidratos e um domínio para a inativação do ribossomo (PEUMANS & VAN DAMME, 1998);

As superlectinas são lectinas de natureza quimérica que consistem de, no mínimo, dois domínios ligantes a carboidratos, os quais são estruturalmente distintos e reconhecem carboidratos diferentes. Ex: lectinas da tulipa (VAN DAMME *et al.*, 1996).

As estratégias utilizadas por essas moléculas para gerar sua especificidade por carboidratos incluem a formação de pontes de hidrogênio com moléculas de água, modificações pós-traducionais e oligomerizações (VIJAYAN; CHANDRA, 1999). As interações proteína – carboidrato fazem das lectinas ferramentas valiosas em diversos processos biológicos. Dentre estes, podem ser citadas as interações patógeno-hospedeiro, a comunicação célula-célula, a indução de apoptose, metástases e diferenciação celular (ZIÓŁKOWSKA; WLODAWER, 2006).

Além disso, as lectinas podem se ligar a certos componentes da membrana das células sanguíneas, ocasionando aglutinação, que constitui no principal atributo para a sua detecção, purificação e caracterização (LIS; SHARON, 1998). Desta forma, essas proteínas são atualmente consideradas como possíveis ferramentas de elucidação da informação biológica contida nos açúcares, tendo em vista seu importante papel no reconhecimento celular (CARDOZO *et al.*, 2007).

1.2.1 Lectinas de Algas Marinhas

As lectinas de algas marinhas geralmente apresentam massas moleculares inferiores às de vegetais superiores; não apresentam afinidade por açúcares simples, mas por oligossacarídeos complexos, frequentemente glicoproteínas; e não requerem cátions divalentes para a sua atividade biológica (ROGERS & HORI, 1993). Além disso, estas proteínas ocorrem principalmente na forma monomérica e têm uma alta proporção de aminoácidos ácidos, com ponto isoelétrico (*pI*) entre 4 e 6 (HORI; MIYAZAWA; ITO, 1990).

O primeiro estudo para evidenciar a presença dessas lectinas utilizou eritrócitos humanos e foi relatado por Boyd *et al.* (1966). Após testarem 24 extratos aquosos, os autores constataram que seis extratos preparados com algas pardas (Phaeophyceae) e um de alga azul (Cyanophyceae) aglutinaram eritrócitos dos grupos A e O. Extratos de uma alga verde (Chlorophyceae) e dois de algas pardas aglutinaram inespecificamente eritrócitos de todos os grupos, enquanto que o extrato de uma alga vermelha (Rhodophyceae) apresentou especificidade por eritrócitos do tipo A. Desde então, as lectinas vêm sendo frequentemente encontradas em

algas marinhas, sendo as algas vermelhas as mais estudadas, seguidas pelas algas verdes e pardas (EL GAMAL, 2010).

No Brasil, esses estudos iniciaram com Ainouz & Sampaio (1991). Ao estudarem a ocorrência de lectinas em algas marinhas do Nordeste brasileiro, verificaram que os extratos salinos de dez espécies aglutinaram eritrócitos de coelho, enquanto sete, seis e quatro extratos aglutinaram eritrócitos de galinha, boi e carneiro, respectivamente.

Examinando 96 novas espécies, Rogers *et al.* (1977) constataram que o tratamento dos eritrócitos com enzimas proteolíticas facilitavam a detecção das lectinas de algas marinhas. O uso de enzimas proteolíticas possibilita uma aglutinação mais forte devido, provavelmente, a uma combinação de fatores como a remoção de sialoglicoproteínas e suas cargas negativas da superfície dos eritrócitos; redução no impedimento estérico causado por polipeptídeos dos eritrócitos e aparecimento de carboidratos e glicoproteínas anteriormente não acessíveis na superfície dessas células (LIS & SHARON, 1986).

Estudos comparativos realizados com sangue de diferentes animais comprovaram que os eritrócitos de coelho são mais susceptíveis à aglutinação por extratos de algas (HORI; MIYAZAWA; ITO, 1981). Esses dados e a praticidade de obtenção justificam uma maior utilização dos eritrócitos de coelho nos trabalhos de detecção de lectinas em algas marinhas, em detrimento dos eritrócitos humanos.

Sabe-se que, nos vegetais superiores, as lectinas estão envolvidas na defesa contra bactérias e fungos patogênicos, através do reconhecimento e imobilização de micro-organismos via ligação, prevenindo o seu crescimento e multiplicação (LIAO *et al.*, 2003). Porém, até o presente, pouco se sabe sobre o envolvimento das lectinas nas funções fisiológicas das algas.

1.3 Isolamento e Purificação de Lectinas de Algas Marinhas

A primeira lectina de alga marinha a ser purificada e caracterizada parcialmente foi a da alga vermelha *Ptilota plumosa* (ROGERS; BLUNDEN; EVANS, 1977). O isolamento de lectinas de algas marinhas passa por uma série de etapas que começa com a preparação de um extrato total a partir do contato da alga com soluções tamponantes. Após isso, pode-se submeter o extrato obtido a precipitações salinas (salting out), principalmente com sulfato de amônio, e a procedimentos cromatográficos (sequenciais ou não). Dentre esses procedimentos estão as

cromatografias gasosas, de troca iônica, de interação hidrofóbica, de afinidade e de filtração em gel (HARNEDY; FITZGERALD, 2011).

A cromatografia de troca iônica é muito eficiente principalmente nas etapas iniciais de purificação, pois a resina adsorve pigmentos dos extratos protéicos. Nagano *et al.* (2005) obtiveram a lectina da alga marinha vermelha *Hypnea cervicornis* pela aplicação do extrato protéico em coluna cromatográfica de troca iônica em gel de DEAE-Sepharcel. Leite *et al.* (2005) isolaram a lectina da alga marinha vermelha *Gracilaria ornata* através de cromatografias sequenciais de troca iônica em DEAE-celulose e afinidade em coluna de Mucina-Sepharose 4B.

A estratégia de cromatografias sequenciais pode ser substituída pelo uso direto da cromatografia de afinidade, desde que se conheça a especificidade da lectina e a natureza dos pigmentos algais, os quais podem danificar a coluna ao se ligarem fortemente à matriz cromatográfica. Costa *et al.* (1999) utilizaram a manana de levedura em procedimentos cromatográficos de afinidade para o isolamento da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida*. Sampaio *et al.* (1997) isolaram a lectina da alga *Ptilota filicina* por cromatografia de afinidade, utilizando a galactose presente na goma de guar reticulada.

1.3.1 Lectina da Alga Marinha Vermelha *Solieria filiformis*

A lectina da alga *S. filiformis* foi purificada por Benevides *et al.* (1996) através da obtenção do extrato total com tampão fosfato 20 mM, pH 7,0, seguido da precipitação com sulfato de amônio até 70% de saturação e procedimentos cromatográficos de troca iônica em DEAE-celulose e de afinidade em coluna de Manana-Sepharose CL-4B. Os autores constataram que a atividade hemaglutinante da lectina, utilizando eritrócitos de coelho tratados com tripsina, não é dependente de cátions divalentes, é inibida pelas glicoproteínas manana, avidina, ovalbumina e *egg-white* e estável ao calor por 30 minutos a 50 °C. A massa molecular aparente foi estimada em 29 kDa, por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol.

Posteriormente, Holanda *et al.* (2005) purificaram a mesma lectina, utilizando a metodologia descrita acima, mas com algumas modificações. A lectina foi, então, purificada através de extração com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, precipitação com sulfato de amônio até 80% de saturação e cromatografia de afinidade em coluna de Manana-Sepharose 4B. Esse

trabalho confirmou a massa molecular aparente da lectina de 29 kDa, por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.

1.4 Aplicações e Atividades Biológicas de Lectinas de Algas Marinhas

As lectinas têm sido alvo de pesquisas no mundo inteiro. Isso se deve à sua impressionante capacidade de ligar-se especificamente a carboidratos ou a substâncias que os contêm, propiciando um imenso campo de aplicação biológica em diversas áreas, como na agricultura, na bioquímica, nas ciências biomédicas e na farmacologia. Nesse contexto, um atrativo para a utilização de lectinas de algas marinhas é o fato das mesmas possuírem massa molecular menor do que as lectinas de plantas, e, por isso, elas seriam mais apropriadas para o uso como ferramentas biológicas, pois o menor tamanho dessas moléculas implicaria em uma menor reação antigênica (ROGERS & HORI, 1993).

Estudos realizados com as lectinas das algas *Solieria robusta*, *Euclima serra*, *E. amakusaensis* e *E. cottonii* demonstraram que as mesmas apresentam forte atividade mitogênica (HARNEDY; FITZGERALD, 2011).

A lectina da alga marinha vermelha *Gracilaria ornata* inibiu a emergência das larvas do gorgulho *Callosobruchus maculatus*, mostrando, então, uma potente ação inseticida (LEITE *et al.*, 2005).

Efeitos antinociceptivos significantes têm sido demonstrados por lectinas de algumas espécies de algas marinhas. Dentre essas estão as algas vermelhas *Bryothamnion seaforthii*, *B. triquetrum* e *Amansia multifida* e a alga verde *Caulerpa cupressoides* (VIANA *et al.*, 2002; NEVES *et al.*, 2007; VANDERLEI *et al.*, 2010).

Com relação aos estudos sobre inflamação, algumas lectinas de algas tiveram efeitos pró-inflamatórios, induzindo a migração de neutrófilos em ratos e camundongos (NEVES *et al.*, 2001). Enquanto outras, como as lectinas das algas *Hypnea cervicornis* e *Pterocladia capillacea* apresentaram efeito anti-inflamatório (BITENCOURT *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

Estudos realizados com a lectina da alga *S. filiformis* verificaram que essa proteína possui efeito sobre o crescimento de eubactérias patogênicas, inibindo o crescimento de algumas espécies Gram-negativas (HOLANDA *et al.*, 2005). Além disso, Nascimento (2003) verificou

que essa lectina possui atividade tóxica contra o ciclo evolutivo do ectoparasita *Boophilus microplus* (carrapato bovino). Apesar da existência desses estudos, ainda há vários aspectos a serem explorados com relação ao potencial farmacológico e biotecnológico da lectina dessa alga.

1.5 Dor e Nociceção

O sistema nervoso sensorial é a parte do sistema nervoso responsável pela análise dos estímulos provenientes do meio ambiente externo e interno do organismo. Os receptores nervosos periféricos para a dor foram ao longo do tempo se desenvolvendo, facilitando a condução nervosa após estímulos de alto limiar, sempre com o objetivo de evitar situações desagradáveis, manter as funções fisiológicas e preservar a vida. Assim, o sistema nervoso sensorial capacita o indivíduo à nociceção e à dor propriamente dita (PERL, 2011).

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como uma desagradável experiência emocional e sensorial associada com atual ou potencial dano ao tecido, ou descrita em termos de tais danos. Já a nociceção é definida como um processo neural de codificação e processamento do estímulo nocivo. Nociceção e dor não podem ser confundidos, pois um pode ocorrer sem o outro (LOESER; TREEDE, 2008).

O estímulo nociceptivo causa dano tecidual, ativando um discreto conjunto de órgãos sensoriais periféricos chamados de nociceptores. Esses órgãos são as terminações de fibras nervosas de pequeno diâmetro que podem ser minimamente mielinizadas (fibras A δ) ou não mielinizadas (fibras C). Os nociceptores podem ser ativados por várias formas de energia, incluindo mecânica, eletromagnética, elétrica, térmica e estímulo químico (COUTAUX *et al.*, 2005). Além disso, podem ainda ser ativados por diversos neuromediadores inflamatórios (substâncias algogênicas) liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, facilitando a transmissão dolorosa. Dentre estes, destacam-se a acetilcolina, a histamina, a bradicinina, o leucotrieno, a substância P, o fator de ativação plaquetária (PAF), os radicais ácidos, o íon potássio, as prostaglandinas, os tromboxanos, as interleucinas e o fator de crescimento nervoso (NGF). Esses neuromediadores periféricos, em geral, facilitam a despolarização da membrana neuronal por tempo prolongado, exacerbando a hiperalgesia, aumento da resposta a um estímulo que normalmente é doloroso, ou a alodínia, dor devido a um estímulo que normalmente não provoca dor (WRIGHT, 1999).

Em termos de duração, a dor pode ser transitória, aguda ou crônica. Na dor transitória, há ativação dos nociceptores independente da existência ou não de qualquer dano tecidual, sendo este tipo de dor responsável pela proteção do organismo frente a possíveis danos físicos oriundos de estresse tecidual ou mesmo ambiental (LOESER; MELZACK, 1999).

A dor aguda caracteriza-se por ser pontual, delimitada e com estimulação dos nociceptores, desaparecendo com a resolução do processo patológico (COUTAUX *et al.*, 2005). Usualmente, pode ser aliviada pela administração local de agentes farmacológicos, como drogas anti-inflamatórias não esteroidais, ou com abordagens não-farmacológicas, como friccionar a área afetada ou aplicar gelo (MCDOUGALL, 2011).

A dor crônica geralmente é aquela que persiste mesmo depois de finalizado o processo causador do estímulo nociceptivo. É assim considerada quando a persistência é superior a 3 meses (MCDOUGALL, 2011).

Quanto à fisiopatologia, a dor também pode ser classificada em (RANG *et al.*, 2003):

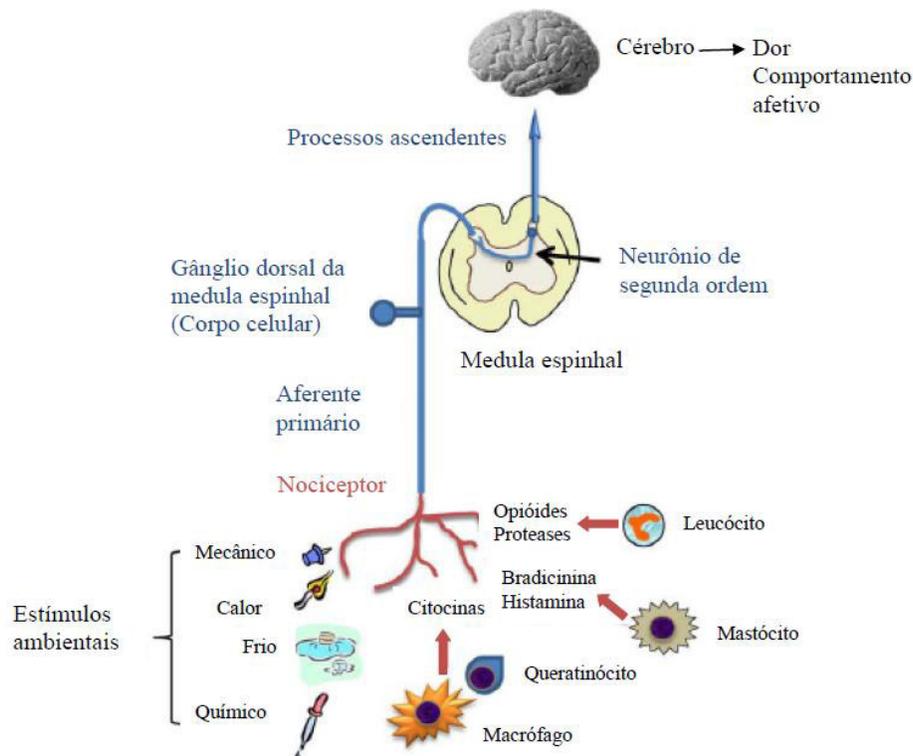
- 1) Nociceptiva – ocorre quando existe um traumatismo nos receptores nociceptivos, devido a alterações na sua estrutura anátomo-funcional com liberação de substâncias algogênicas nos tecidos;
- 2) Neurogênica – é aquela que ocorre com o dano diretamente sobre as inervações;
- 3) Neuropática – resultante do processamento somatossensorial anormal em nível periférico ou central, como, por exemplo, a dor do membro fantasma;
- 4) Inflamatória – caracterizada pela sensibilização dos neurônios produzida pela ativação da cascata de citocinas liberadas no tecido inflamatório e de células do sistema imunobiológico;
- 5) Psicogênica – é aquela que não possui causa orgânica, mas se expressa em consequência de problemas psicológicos (MENEZES, 1999).

Visto que a dor, que é medida pela expressão verbal, é uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução de estímulo nocivo ambiental, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo, o termo nocicepção é utilizado com melhor precisão em testes com animais (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

Assim, a nocicepção inclui os mecanismos pelos quais os estímulos nocivos são detectados pelo sistema nervoso periférico, codificados, transferidos e inconscientemente tratados pelo sistema nervoso (BARROT, 2012). A maioria dos tipos de dor começa na periferia com um

estímulo nocivo ativando os nociceptores, que possuem um alto limiar de estímulo, sendo necessário um estímulo intenso para originar um potencial de ação (FIGURA 2). Esse estímulo físico é posteriormente traduzido em um sinal eletroquímico que é transmitido da periferia até o sistema nervoso central, através de nervos aferentes primários. Ao chegar no corno dorsal da medula espinhal, esses impulsos são transmitidos via sinapses químicas aos neurônios de segunda ordem, onde são posteriormente transportados ao longo de vias ascendentes para centros superiores no cérebro. Por levar esses impulsos a áreas específicas do cérebro, como o córtex somatossensorial e a amígdala, os sinais eletroquímicos são moldados numa experiência psicofísica incorporando alguns reflexos motores protetores e respostas emocionais (MCDUGALL, 2011).

Figura 2 - O Caminho da Dor ao Cérebro.



Fonte: Adaptado de McDougall, 2011. Estímulos ambientais nocivos podem ativar nociceptores periféricos, levando a uma sensação de dor. Várias células residentes na vizinhança do nervo terminal podem liberar mediadores que podem aumentar ou reduzir o limiar da ativação nervosa.

Existem inúmeros testes que podem ser utilizados para avaliar a nocicepção em modelos murinos, com o objetivo de desenvolver novos fármacos para o controle da dor. Nessas avaliações, podem-se utilizar estímulos elétricos, térmicos, mecânicos ou químicos (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Alguns desses testes dependem do aparecimento do comportamento de evitar determinado estímulo, através, geralmente do reflexo de retirada da pata ou cauda. Neste caso, o estímulo pode ser considerado como fixo. Como exemplos, têm-se os testes que utilizam a estimulação térmica, dentre eles, estão os testes de placa quente ou fria. Outros ensaios podem depender do limiar do estímulo necessário para provocar um reflexo. Neste caso, o estímulo é uma variável com valor crescente ou podem ser utilizados sucessivos estímulos em um valor fixo. Como exemplo, tem-se a estimulação mecânica, através de testes como o de von Frey. Por último, alguns testes nociceptivos podem depender da observação e classificação de comportamentos específicos. Como exemplos, têm-se os ensaios utilizando estímulos químicos inflamatórios (carragenana) ou irritantes (ácido acético e formalina) (BARROT, 2012).

1.6 Inflamação

Inflamação ou flogose (do latim *inflamare* e do grego *phlogos*, que significa pegar fogo) é um processo fisiológico que ocorre como uma resposta natural de muitos organismos multicelulares a uma variedade de agentes estranhos a eles, incluindo parasitas, microrganismos patogênicos, substâncias químicas tóxicas e danos físicos aos tecidos (SCOTT; BRYANT; BIDGGOD, 1999). A inflamação é resultado de uma cascata de eventos fisiológicos, conhecida como resposta inflamatória, que promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da infecção ou injúria, mas, quando acontece de forma exacerbada, pode ter inúmeros efeitos deletérios, causando doenças como a artrite reumatóide, psoríase e a doença inflamatória intestinal (BILATE, 2007). Assim, a dor inflamatória corresponde à liberação de mediadores químicos por células não neuronais no local de injúria.

O processo inflamatório compreende dois eventos que ocorrem simultaneamente durante o curso evolutivo desta reação, os eventos vasculares e celulares. Os vasculares incluem a vasodilatação, o aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular e o extravasamento de líquidos e proteínas plasmáticas para o espaço extravascular; já os celulares englobam a migração

de leucócitos para o foco inflamatório e a coagulação (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985; WANG; DUDEK, 2009). Os eventos vasculares favorecem a ocorrência dos eventos celulares. Além disso, mediadores vasoativos e quimiotáticos liberados pelo próprio infiltrado celular contribuem para a amplificação dos eventos vasculares (BEVILACQUA *et al.*, 1994).

Devido a esses eventos, a inflamação é caracterizada por calor, rubor, edema, dor e, posteriormente, a possível perda da função do tecido lesado. Essas características são conhecidas como os sinais cardinais da inflamação (LARSEN; HOLT, 2000).

Em relação à persistência dos sintomas, a inflamação pode ser classificada em aguda ou crônica (IWALEWA *et al.*, 2007). A fase aguda é de curta duração (minutos, horas ou até poucos dias) e suas principais características são a vasodilatação arteriolar e venular, a exsudação de fluido rico em proteínas plasmáticas (edema), a migração de leucócitos e o acúmulo de neutrófilos no sítio da inflamação, com a possível ativação da cascata de coagulação (SPLETTSTOESSER; SCHUFF-WERNER, 2002). A crônica é de longa duração (semanas ou anos) e associa-se à presença de monócitos, linfócitos, macrófagos, plasmócitos e fibroblastos, além da proliferação de vasos sanguíneos e do tecido conjuntivo, fibrose e necrose tecidual.

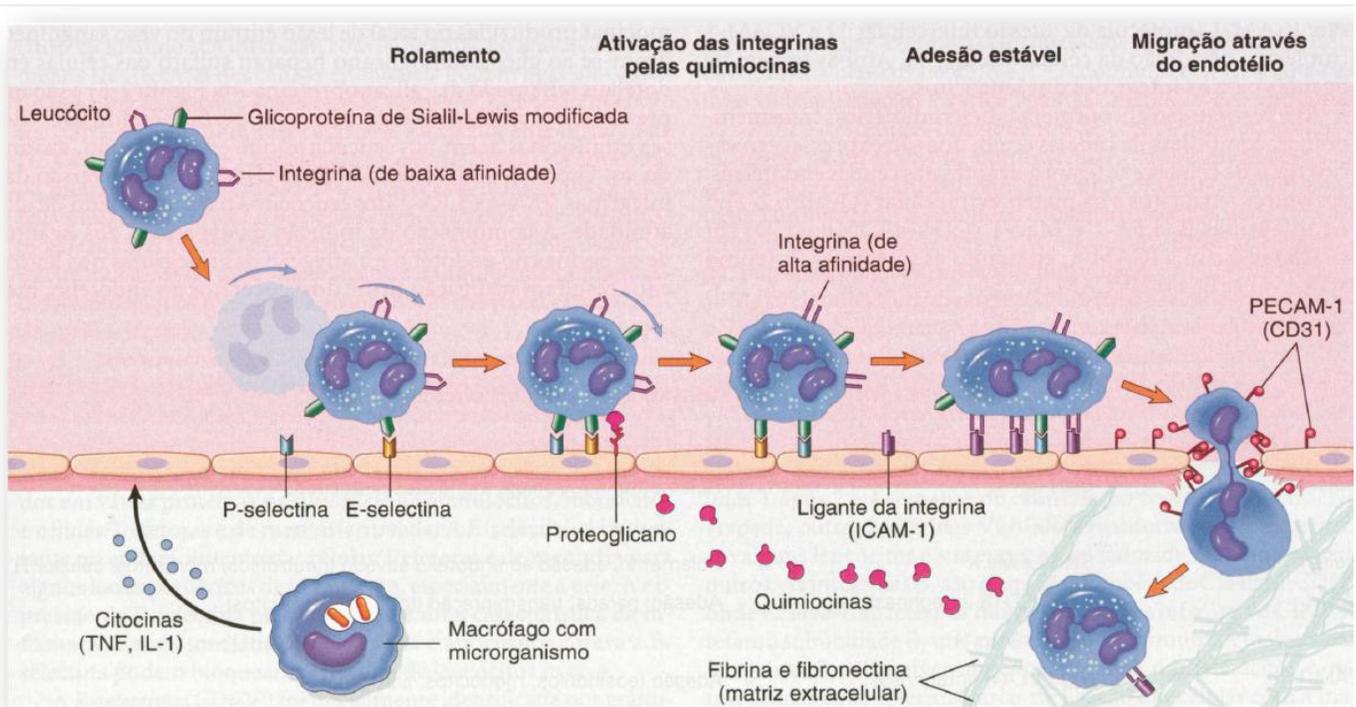
A inflamação age no sentido de remover ou inibir o agente estranho, desencadeando uma série de eventos que promovem o retorno do organismo à condição normal, incluindo a reconstrução do tecido lesado. Essas respostas de defesa são iniciadas e reguladas por uma variedade de mediadores liberados por diferentes tipos de células. A compreensão dos efeitos, dos mecanismos de ação e dos usos clínicos dos fármacos que afetam as respostas inflamatórias e imunológicas depende de uma avaliação do modo pelo qual essas células e seus mediadores interagem (VANDERLEI, 2008).

1.6.1 Principais Células Envolvidas no Processo Inflamatório

Diversas são as células envolvidas no processo inflamatório. Algumas células já estão presentes no tecido afetado, tais como células do endotélio vascular, mastócitos e células mononucleares residentes. Enquanto outras, como os leucócitos migram para o local da lesão. Os leucócitos, células incolores implicadas nas defesas do organismo, são ativamente móveis e podem ser divididos em duas classes: células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos) (BEVILACQUA *et al.*, 1994).

A passagem dos leucócitos do vaso para os tecidos (extravasamento) decorre de uma sequência de eventos que inclui três passos (FIGURA 3): 1) marginação (movimento das células da corrente sanguínea para a periferia das veias), rolamento e adesão ao vaso sanguíneo; 2) transmigração através do endotélio para o tecido lesado (diapedese); e 3) quimiotaxia ou processo de locomoção das células inflamatórias para o local afetado, seguindo um gradiente químico. Todas essas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais de moléculas de adesão e de mediadores quimiotáticos (SPRINGER, 1994).

Figura 3 - Sequência de Eventos Leucocitários na Inflamação.



Fonte: Robbins *et. al.*, 2005. A figura representa as etapas de rolamento, adesão e migração celular na inflamação, bem como a liberação de mediadores locais, que estão estreitamente relacionados aos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória.

Dentre as moléculas de adesão estão as selectinas, integrinas e imunoglobulinas de adesão. As selectinas são lectinas que interagem com açúcares e/ou glicoproteínas e estão, principalmente, envolvidas com a fase de rolamento dos leucócitos (PANÉS; PERRY;

GRANGER, 1999). Os três tipos de selectinas existentes foram denominados de acordo com os tecidos onde foram identificadas: L-selectina (expressa pelos leucócitos circulantes); P-selectina (rapidamente expressa pelas células endoteliais ou plaquetas expostas a histamina ou trombina); e E-selectina (expressão induzida após algumas horas de ativação das células do endotélio por IL-1, TNF- α ou endotoxina) (SPRINGER, 1994).

As integrinas (β_2) são proteínas presentes na membrana dos leucócitos e que podem ter sua expressão aumentada, após a ativação destas células por mediadores inflamatórios como o PAF ou outras citocinas (LEY, 2002). Interagem com as imunoglobulinas de adesão.

Enquanto que as imunoglobulinas de adesão (ICAMs) são moléculas que estão presentes no endotélio, sendo que as mais relacionadas ao processo de migração são: ICAM-1 (Moléculas de adesão intercelular-1), ICAM-2 (Moléculas de adesão intercelular-2), VCAM-1 (molécula de adesão vascular) e PCAM-1 (molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta) (BEVILACQUA *et al.*, 1994).

A ação coordenada dessas moléculas é necessária para um efetivo e estável rolamento dos leucócitos. Assim, através da produção de compostos vasoativos, de ativadores leucocitários baseados em lipídios, de citocinas quimiotáticas e da expressão de moléculas de adesão, as células endoteliais orquestram o movimento de fluidos e leucócitos que caracteriza a inflamação, ocasionando o aumento da liberação de plasma e de células sanguíneas para a área afetada (BEVILACQUA *et al.*, 1994).

Os neutrófilos estão presentes em grande quantidade no sangue periférico (50-70% das células brancas) e medeiam as fases mais iniciais das respostas inflamatórias. Eles têm núcleo segmentado, tipicamente com 2 a 5 lobos conectados entre si através de finas fitas de cromatina. O seu citoplasma apresenta grânulos de dois tipos: os grânulos primários (azurofílicos) que contêm mieloperoxidase, lisozimas, colagenase, elastase e catepsinas; e os grânulos secundários que contêm lisozima, colagenase e o complexo enzimático associado à explosão respiratória. Apresentam funções relacionadas à defesa do hospedeiro contra micro-organismos invasores, tanto no meio extracelular, quanto intracelular, matando-os através da ação de enzimas digestivas presentes nos seus grânulos citoplasmáticos. São também responsáveis pela remoção de restos celulares. Apesar do curto ciclo de vida (8 – 20 h), a exposição dos neutrófilos aos mediadores inflamatórios presentes no ambiente extracelular, como citocinas e produtos derivados de

bactérias, pode estender a sua sobrevivência significativamente, e, assim, capacitá-los para realizar funções regulatórias mais sofisticadas e prolongadas (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000).

Os mastócitos são células globulosas e grandes. Possuem núcleo esférico e central e grânulos citoplasmáticos eletrodensos e ligados à membrana. Estes grânulos contêm heparina, leucotrienos, histamina e fator quimiotático de eosinófilos da anafilaxia. Eles estão localizados em órgãos como a pele, pulmões, vias gastrintestinais, mucosas nasais e estão estrategicamente posicionados para interagir com antígenos ingeridos ou inalados e, assim, secretar seus mediadores inflamatórios, que produzem aumento na permeabilidade vascular, vasodilatação, contração de músculo liso, secreção de muco, potencialização da lesão tecidual e quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos (MOTA *et al.*, 2006).

Os monócitos representam células efectoras do sistema imunológico equipadas com receptores de quimiocina e de moléculas de adesão que auxiliam na migração dessas células do sangue aos tecidos, durante a inflamação. É uma célula grande, quando comparada aos linfócitos. De modo geral, apresenta um núcleo em forma de ferradura e contém grânulos azurofílicos pálidos. Seus lisossomos contêm peroxidase e várias hidrolases ácidas, importantes para a destruição intracelular dos micro-organismos. Eles podem se diferenciar em células dendríticas inflamatórias ou em macrófagos durante a inflamação (GEISSMANN *et al.*, 2010).

Os macrófagos podem estar em diferentes tecidos, recebendo, então, nomes especiais para designar localizações específicas e são resultantes da diferenciação de monócitos. São células fagocíticas residentes nos tecidos linfóides e não linfóides e acredita-se que estão envolvidos na homeostase do tecido, via remoção de células apoptóticas e a produção de fatores de crescimento. Além disso, são as células efectoras dominantes nos estágios mais tardios da resposta imunológica natural (1 ou 2 dias após a infecção). Quando ativados, sofrem modificações morfológicas, metabólicas e funcionais, tais 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 micro-organismos intracelulares facultativos e células tumorais; e expressão de moléculas efectoras como peroxidase, protease citolítica, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias. Os macrófagos são atraídos aos sítios de inflamação através de fatores quimiotáticos derivados de linfócitos, neutrófilos, fibroblastos e do soro, e têm como principal mecanismo efector a fagocitose (KESHERWANI; SODHI, 2007; IWALEWA *et al.*, 2007; GEISSMANN *et al.*, 2010).

As plaquetas são corpúsculos anucleados com a forma de disco derivados de células gigantes da medula óssea, os megacariócitos. Após um trauma ou lesão das células endoteliais, as plaquetas aderem e agregam-se à superfície endotelial do tecido vascular danificado, liberando as substâncias contidas nos seus grânulos. Portanto, vários mediadores são derivados das plaquetas, incluindo tromboxano A₂, fibrinogênio, fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e outros. Como resultado, ocorre aumento da permeabilidade capilar, ativação do complemento e, portanto, atração dos leucócitos (IWALEWA *et al.*, 2007; WAGNER, 2005).

Os eosinófilos geralmente possuem núcleo bilobado e muitos grânulos citoplasmáticos, perfazendo, então, 2 a 5% dos leucócitos sanguíneos em indivíduos saudáveis (não-alérgicos). As funções dos eosinófilos estão associadas com respostas alérgicas e defesa contra parasitas, liberando mediadores citotóxicos, citocinas e apresentando antígenos. Além disso, eles também liberam histaminase e arilsulfatase, que inativam os produtos dos mastócitos, como histamina e alguns leucotrienos (DOMBROWICZ; CAPRON, 2001; PUXEDDU *et al.*, 2005).

Os basófilos são encontrados em concentrações muito pequenas na circulação, perfazendo menos de 1% do total de leucócitos e possuem um núcleo volumoso (bilobado ou multilobado). Seus grânulos possuem histaminas, proteases e fator quimiotático para eosinófilo e neutrófilo. Os basófilos estão associados com a resposta imunológica a alérgenos, como na ocorrência de asma e anafilaxias (SPRINGER, 1994; IWALEWA *et al.*, 2007).

1.6.2 Principais Mediadores Envolvidos na Inflamação

Os mediadores da inflamação são substâncias formadas e liberadas, concomitante ou sequencialmente, no local da lesão, podendo ter origem plasmática ou celular. Os de origem plasmática são formados a partir da ativação de quatro cascatas enzimáticas: sistema da coagulação (trombina, plasmina), sistema fibrinolítico (fibrina), sistema das cininas (bradicinina) e sistema complemento (C3b, C5a); e os de origem celular, como histamina, serotonina, prostaglandinas, fator ativador plaquetário, leucotrienos e citocinas, são produzidos como consequência da ativação de células, sejam elas residentes ou não (SCOTT; LAM; FERRELL, 1994). Os mediadores estão envolvidos na gênese e manutenção dos eventos característicos da

reação inflamatória e se ligam a receptores específicos nas células-alvos podendo, inclusive, estimular a liberação de outros mediadores (ZHOU *et al.*, 2007).

a) Sistema das cininas

Este sistema de enzimas tem como funções a ativação das plaquetas e a produção de bradicinina e caliceína. A bradicinina é um potente agente vasoativo, induz vasodilatação, contração da musculatura lisa e dor. A caliceína é um agente quimiotático neutrofílico (SCOTT; LAM; FERRELL, 1994).

b) Sistema complemento

É formado por cascatas de reações enzimáticas. Por meio das vias clássica, alternativa e da lectina, são produzidos fragmentos protéicos que podem atuar como opsoninas (ligam-se aos micro-organismos, facilitando a fagocitose dos mesmos), como o C3b; mediadores inflamatórios (promovem o recrutamento de granulócitos e monócitos) e anafilotaxinas (induzem a degranulação de mastócitos), como o C5a, C3a e C4a (RAMAGLIA; DAHA; BAAS, 2008).

c) Sistema de coagulação

É ativado pelo fator de Hageman (XII), sendo que a trombina e o fator Xa fazem parte desse sistema. A trombina leva à formação de fibrinopeptídeos cujas funções são aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, adesão leucocitária e proliferação fibroblástica. Por outro lado, o fator Xa promove, além de aumento da permeabilidade, exsudação leucocitária (WHITE, 1999).

d) Sistema fibrinolítico

Dentro da resposta inflamatória está envolvido na ativação do sistema complemento e participa do aumento da permeabilidade vascular (COLUCCI; SEMERARO, 2011).

e) Aminas vasoativas

Como exemplos, têm-se a histamina e a serotonina. A histamina pode ser encontrada em mastócitos, basófilos e plaquetas, sendo liberada por exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas. É o primeiro mediador a atuar, gerando o aumento da permeabilidade vascular e a contração do endotélio venular com alargamento de junções celulares interendoteliais (HEBERT; JUST; SCHMIDT, 2001). A serotonina apresenta ações semelhantes às da histamina, sendo encontrada nas plaquetas (GOADSBY; LIPTON; FERRARI, 2002). Pode atuar também em uma variedade de receptores farmacológicos, agindo como neurotransmissor (WOUTERS; FARRUGIA; SCHEMANN, 2007).

f) Derivados do ácido araquidônico

A estimulação das membranas celulares induz a metabolização do ácido araquidônico pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂). Em seguida, ocorre a sua biotransformação em prostaglandina (PG) ou tromboxano, via ação de ciclooxygenases (COX); e em leucotrienos (LT) ou lipoxinas, via ação das lipoxigenases (WANG; HONN; NIE, 2007).

As prostaglandinas podem participar de reações alérgicas e, durante a reação de mastócitos em tecidos, podem provocar a contração da musculatura lisa, permeabilidade vascular, sensação de prurido e dor e agregação plaquetária (WHITE, 1999). Além disso, possuem ação vasodilatadora, além de potencializar os efeitos quimiotáticos e aumentar a permeabilidade de outros mediadores (KAM; SEE, 2000).

Dentre os leucotrienos mais importantes está o LTB₄, que causa aderência de neutrófilos ao endotélio das vênulas pós-capilares, sendo também um potente agente quimiotático para neutrófilos. O LTC₄, LTD₄ e LTE₄ causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular (MOORE; WEISS, 1985).

g) Enzimas lisossomais

Existem várias enzimas lisossomais presentes em grânulos de neutrófilos e mastócitos que podem atuar na inflamação, dentre elas: mieloperoxidase (citotóxica e pode inativar fatores quimiotáticos, limitando o fluxo de neutrófilos); elastina e catepsina, que têm importantes papéis em muitos processos, incluindo defesa do hospedeiro, remodelagem do tecido e migração de leucócitos (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982; MEDZHITOV, 2008).

h) Óxido Nítrico

É vasodilatador e seu envolvimento nessa resposta pode ter relação com a sua habilidade em aumentar a permeabilidade vascular e o edema através de mudanças no fluxo sanguíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas inflamatórias. Além disso, reduz a agregação e adesão plaquetária e é citotóxico para determinados micróbios e células tumorais (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

i) Fator ativador de plaquetas (PAF)

É ativado quando há liberação de histamina, trombinas e LTB₄, sendo sintetizado a partir de fosfolípidos de membrana por ativação de fosfolipases (PLA₂) (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). O PAF regula a liberação de citocinas, amplificando a resposta inflamatória, aumenta a permeabilidade vascular por contração das células endoteliais, estimula a

agregação plaquetária e as enzimas lisossômicas para produção de superóxidos (TIEMANN *et al.*, 2001).

j) Citocinas

São proteínas de baixa massa molecular produzidas por diferentes tipos celulares do sistema imune e atuam na comunicação entre as células, promovendo a indução ou regulação da resposta imune. Os vários tipos de citocinas incluem interleucinas, fatores de crescimento de colônia da medula ossea, interferons e fatores de necrose tumoral. Como exemplos, têm-se a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que induzem efeitos locais, tais como indução da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, facilitando a migração de leucócitos e efeitos sistêmicos como a indução de proteínas de fase aguda, podendo promover a febre. Esta resposta local é firmemente controlada pela produção de interleucinas anti-inflamatórias (IL-10) e antagonista endógeno (BILATE, 2007).

k) Quimiocinas: As quimiocinas são pequenos polipeptídeos (90-130 resíduos de aminoácidos), constituindo um subgrupo de citocinas. Controlam a adesão, quimiotaxia, recrutamento e ativação de vários tipos de leucócitos. As quimiocinas também controlam e atuam em diversos processos biológicos como hematopoiese, angiogênese e metástase de tumores (BILATE, 2007).

l) Substância P

A substância P (SP) é um neuropeptídeo da família das taquicininas, sendo liberada por neurônios aferentes. Estudos em ratos têm mostrado sua produção por células inflamatórias como macrófagos, linfócitos e células dendríticas (O'CONNOR *et al.*, 2004). A SP promove a inflamação devido aos seus efeitos sobre os vasos sanguíneos, provocando vasodilatação e alterando a permeabilidade vascular além de induzir a degranulação de mastócitos (PERNOW, 1983).

1.6.2.1 Via da Hemoxigenase

A hemoxigenase (HO) é uma enzima microsomal que catalisa a degradação do grupo heme em monóxido de carbono (CO), ferro e biliverdina (BVD). Posteriormente, o ferro é sequestrado pela ferritina e a biliverdina é reduzida à bilirrubina pela biliverdina redutase (ABRAHAM, *et al.*, 1988). Três isoenzimas da HO geneticamente distintas são conhecidas: HO-

1, induzida e geralmente expressa como resposta celular ao estresse oxidativo; HO-2 e HO-3, que são constitutivamente expressas na maioria dos tecidos (PAINE *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, vários estudos vêm demonstrando que a HO-1, seu substrato (heme) e seus produtos (CO e BVD) são capazes de modular o processo inflamatório. O heme é capaz de estimular a produção de radicais livres, o aumento de permeabilidade vascular, a expressão de moléculas de adesão e a infiltração de neutrófilos no sítio lesionado (SHONO *et al.* 1996). Assim, o heme possui características pró-inflamatórias, mas, em pequenas concentrações, estimula a produção de HO-1, que irá modular essa resposta inflamatória.

O CO é um potente agente vasoativo gasoso e está envolvido na regulação do tônus vascular, sinalização neuronal, inibição de apoptose e síntese de mediadores inflamatórios (citocinas, NO e prostaglandinas) e reduz respostas inflamatórias em diversos modelos de estresse oxidativo (BARANANO; SNYDER, 2001). O ferro estimula a produção de ferritina, que pode atuar como agente antioxidante (PAINE *et al.*, 2010). A BVD é capaz de reduzir a migração de neutrófilos, exsudação e liberação de mediadores pró-inflamatórios e a expressão de moléculas de adesão (VICENTE *et al.*, 2003). A bilirrubina, produto da conversão de BVD, age como agente antioxidante e citoprotetor (AN *et al.*, 2011).

Portanto, a via da hemoxigenase apresenta inúmeros efeitos protetores ao organismo, dentre eles, estão as capacidades antioxidante, anti-inflamatória e antiapoptótica (GOZZELINO; JENEY; SOARES, 2010).

1.7 Fármacos Utilizados no Controle da Dor e Inflamação

Uma vez que a dor e a inflamação são processos biológicos nos quais muitos mediadores co-participam, substâncias capazes de diminuir a condição inflamatória podem ser empregadas no tratamento contra a dor, com o intuito de inibir a produção de mediadores inflamatórios, ou ainda, no bloqueio das atividades das fibras aferentes, como os bloqueadores dos canais iônicos. Na verdade, a grande maioria dos fármacos presentes no mercado que são utilizados para o controle da dor, possuem um cunho anti-inflamatório (MENDELL; SAHENK, 2003).

Várias abordagens terapêuticas visam o tratamento da dor aguda. Analgésicos, como opióides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), atuam por diferentes mecanismos no sistema nervoso central e periférico (MOORE, 2009).

O termo opióide, vem de ópio (do grego ópion, “suco de papoula”, que, por sua vez, contém muitos alcalóides relacionados à morfina), por isso esse termo aplica-se a qualquer substância, endógena ou sintética, que produza efeitos semelhantes à morfina, e que sejam bloqueados por antagonistas como a naloxona. Os opióides têm ação central, desencadeando analgesia associada à depressão das funções neurovegetativas; são potentes analgésicos com características sedativa e hipnótica, porém as dependências psíquica e física e a tolerância são fatores que limitam seu uso prolongado (GILBERT *et al.*, 2004).

Os opióides exercem seus efeitos por ação em três classes principais de receptores, mu (μ), kappa (κ) e delta (δ), que são produtos de três diferentes genes. A nomenclatura desses receptores foi baseada na sua ativação por diferentes agonistas opióides, como descrito a seguir (JAN; VISCUSI, 2003):

- 1) Receptor μ opióide (MOR) – Responsável por vários efeitos dos opióides, incluindo analgesia supraespinal, depressão respiratória, euforia, sedação, diminuição da motilidade gastrointestinal, bem como dependência física. Medeia os efeitos da morfina;
- 2) Receptor κ opióide (KOR) – Responsável pela analgesia espinal (medular), sedação, dispnéia, dependência, disforia e depressão respiratória. Medeia os efeitos da cetociclazocina;
- 3) Receptor δ opióide (DOR) – É mais importante a nível periférico e está envolvido principalmente em efeitos psicomiméticos e disforia. Medeia os efeitos da encefalina.

A morfina é um opióide que promove analgesia intensa e de longa duração, sem provocar bloqueio simpático ou motor. Assim, além de ser antinociceptiva, a morfina também reduz o componente afetivo da dor. Por outro lado, ocasiona alguns efeitos indesejáveis, como: constipação, retenção urinária, euforia, redução do apetite, hipotermia, bradicardia e tolerância (YUNES *et al.*, 2005).

Os AINEs podem apresentar efeitos analgésico, anti-inflamatório e antipirético. Seu mecanismo de ação geral se dá pela inibição das ciclooxigenases (COX) e, conseqüentemente, da

produção de prostaglandinas e tromboxanos, sendo mais eficiente nas dores somáticas com componente inflamatório (NUNES *et al.*, 2006).

Os AINEs podem ser classificados de acordo com a sua seletividade sobre as isoformas da enzima ciclooxigenase em: AINEs não seletivos, que inibem tanto a COX-1 quanto a COX-2, como por exemplo, têm-se a aspirina (ácido acetil salicílico), a indometacina e o piroxicano; AINEs seletivos, mais específicos para a COX-2, mas ainda atuando na COX-1, como a nimesulida e o meloxicano; e AINEs específicos que agem quase exclusivamente na isoforma COX-2, dentre eles o celocoxibe, o etoroxibe e o lumiracoxibe (VANE; WARNER, 2000).

Alguns AINEs, além de inibir as COXs, podem agir por outros mecanismos, tais como: estabilização da membrana lipossômica, inibição da migração de leucócitos para a área inflamada, interferências na reação antígeno-anticorpo e inibição da biossíntese de mucopolissacarídeo (NUNES *et al.*, 2006). Além disso, podem prevenir danos celulares através da geração de produtos antioxidantes, principalmente, pela ativação da via da hemoxigenase.

O uso dos AINEs torna-se restrito pelo fato de provocarem efeitos adversos, principalmente no trato gastrointestinal, além de efeitos no fígado, rins, baço, sangue e medula óssea (BASIVIREDDY *et al.*, 2004).

Para o tratamento da inflamação, além dos AINEs, os glicocorticóides ou corticosteróides, também são bastante utilizados, como exemplos, têm-se a dexametasona e a hidrocortisona. Possuem grande amplitude de ações farmacológicas, dentre elas, seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, inibindo tanto as manifestações iniciais quanto as tardias do processo inflamatório (ADCOCK *et al.*, 2005). Sua ação farmacológica está relacionada principalmente à inibição da migração celular para a área afetada, através da supressão da expressão de moléculas de adesão, ou da indução da síntese da anexina-1, uma proteína inibidora de PLA₂ (enzima responsável pela liberação de ácido araquidônico e, conseqüentemente, pela ativação da produção de prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos). O complexo esteróide-receptor também é capaz de promover inibição da transcrição de um grande número de citocinas envolvidas na inflamação crônica, destacando-se principalmente a IL-1 e o TNF- α . Além disso, os corticosteróides podem ainda promover uma repressão da síntese dos receptores das citocinas, como dos receptores da IL-2 (KASSUYA, 2006). Dentre os efeitos colaterais desses fármacos

estão: osteoporose, fraqueza muscular, úlceras pépticas, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, fenômenos hemorrágicos, síndrome de Cushing e outros.

A dexametasona é um glicocorticóide sintético muito utilizado e com potentes propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, sendo considerada uma droga de amplo espectro que age sobre vasos sanguíneos; citocinas e outros mediadores lipídicos e glicolipídicos; tipos celulares inflamatórios, principalmente, neutrófilos; e certas enzimas indutoras da inflamação, tais como a COX-2 e iNOS. Pode também atuar inibindo a transcrição de genes que originam receptores, proteínas que suprimem citocinas e, também, proteínas que controlam a ativação, migração, adesão e recrutamento celular (ADCOCK; ITO; BARNES, 2004).

Apesar dos inúmeros medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios existentes, ainda devem ser realizados muitos estudos para que se encontrem moléculas mais seletivas e que não causem tantos efeitos adversos. Por isso, atualmente, tem-se dado grande ênfase a estudos de substâncias naturais que possam apresentar atividade terapêutica e, claramente, venham a representar uma alternativa farmacológica eficaz, segura e menos onerosa à população.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Isolar a lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* e investigar seu efeito na nocicepção e na inflamação aguda, bem como seus possíveis sinais de toxicidade em animais.

2.2 Específicos

- Isolar lectina da alga *S. filiformis* através de cromatografias sequenciais;
- Caracterizar físico-quimicamente e estruturalmente a lectina da *S. filiformis*;
- Avaliar o efeito da lectina da *S. filiformis* na nocicepção em camundongos;
- Avaliar o efeito da lectina da *S. filiformis* na inflamação aguda em ratos;
- Avaliar a toxicidade da lectina da *S. filiformis*, por dose repetida, em camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Alga Marinha

A alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson foi coletada da área de cultivo situada na praia de Fleicheiras (3°13'06'' S; 39°16'47'' W), localizada no município de Trairí, a 130 Km de Fortaleza, no litoral Oeste do Estado do Ceará, Brasil. Essa área tem, aproximadamente, 0,5 ha, com 3-5 m de profundidade e está a 200 m da costa (preamar). Essa espécie está depositada na forma de exsicata (n° 35682) no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (FIGURA 4).

3.1.2 Células Sanguíneas

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

3.1.3 Animais

Foram utilizados camundongos albinos variedade *Swiss* machos e fêmeas (20-25 g) e ratos albinos variedade *Wistar* machos (180-200 g) fornecidos pelo Biotério Central da UFC, mantidos em salas com temperatura ambiente adequada e livre acesso à ração e água no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Os ensaios com os animais seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança, respeitando o princípios dos 3 R's da experimentação animal ("reduction, replacement and refinement"), recebendo aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UFC (CEPA n° 02/11).

Figura 4 - Alga Marinha Vermelha *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson (Rhodophyta, Gigartinales, Solieriaceae).



Foto: Márjory Lima Holanda

Fonte: Márjory Lima Holanda.

Filo: Rhodophyta

Classe: Florideophyceae

Ordem: Gigartinales

Família: Solieriaceae

Gênero: Solieria

Espécie: *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson

3.1.4 Fármacos e Reagentes

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

Acrilamida, N,N-metileno bisacrilamida, albumina sérica bovina, Coomassie Brilliant Blue G-250, marcadores de massa molecular, sulfato de amônio, TEMED, tripsina, Tris, DEAE-Celulose, heparina (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.).

Soluções e drogas usadas nos ensaios de nocicepção: ácido acético (P.A., Merck); formaldeído 38% (P.A., Merck); cloridrato de morfina (Dimorf[®], Cristália, Itapira, SP, Brasil); e indometacina (Indocid[®], Merck Sharp & Dohme; Campinas, SP, Brasil).

Soluções e Drogas usadas no ensaio de inflamação: carragenina lambda tipo IV (Sigma, St. Louis, MO, USA); dexametasona (Decadron[®], Anápolis, GO, Brasil); Dextrana (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA); pentoxifilina (EMS, São Bernardo do Campo, SP, Brazil); meclizina (APSEN, Santo Amaro, SP, Brazil); L-N-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) (Sigma, St. Louis, MO, USA); fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, brometo de hexadecitrimetilamônio (HTAB) e zinco protoporfirina IX (ZnPP IX) (Sigma, St. Louis, MO, USA); Hematoxilina e Eosina (Reagen); e O-dianisidina (Sigma[®], USA).

Kits para dosagens séricas (Labtest[®], Lagoa Santa, MG, Brasil): AST e ALT (Cat. 52 e 53, ANVISA 10009010031 e 10009010027, respectivamente); Uréia (Cat. 27, ANVISA 10009010011) e Fosfatase alcalina (Cat. 40, ANVISA 10009010081). Quando necessário, hidrato de cloral (Vetec; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi usado para anestésiar os animais.

Todos os demais reagentes utilizados no decorrer do trabalho foram de grau analítico, sendo obtidos comercialmente.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Vermelha *Solieria filiformis*

A lectina utilizada neste estudo (LSf) foi obtida da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*, através da metodologia descrita por Benevides *et al.* (1996), com algumas modificações (FIGURA 5).

3.2.1.1 Preparação do Extrato Total

A alga foi cuidadosamente separada de epífitas, lavada com água destilada, seca e macerada em nitrogênio líquido. Após isso, foi colocada em contato com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (TB), na proporção de 1:3 (m/v), por 4 h sob agitação, e filtrada em membrana de nylon. O filtrado foi centrifugado a 6.000 x g por 30 min, a 4 °C. O precipitado foi, então, desprezado e o sobrenadante obtido, denominado de extrato total.

3.2.1.2 Concentração Protéica por Precipitação com Sulfato de Amônio

O extrato total obtido na etapa anterior foi submetido à precipitação com sulfato de amônio até 70% de saturação, durante 4 h, à temperatura ambiente. Após centrifugação (6.000 x g, por 30 min, a 4 °C), o sobrenadante foi ressuspenso com TB e dialisado contra água destilada (por 72 h) e TB (por 24 h), sendo, então, denominado F0/70.

3.2.1.3 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose

A fração F0/70 foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, previamente equilibrada com TB. Após a completa eluição da fração não retida na coluna, foi realizado um “step wise” com o mesmo tampão de equilíbrio, contendo NaCl nas concentrações de 0,3 e 0,5 M, para a eluição das frações protéicas adsorvidas na matriz. Durante esse procedimento cromatográfico, foi mantido um fluxo constante de 60 mL/hora, coletando frações de 5 mL/tubo. A absorvância a 280 nm e a atividade hemaglutinante foram determinadas para cada tubo. A fração ativa (PI-DEAE) foi dialisada contra água destilada, por 24 h, e liofilizada.

3.2.1.4 Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100

A fração ativa oriunda da cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose (PI-DEAE) foi aplicada em cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100, previamente equilibrada com TB. As frações foram eluídas com o mesmo tampão de equilíbrio.

Durante esse procedimento cromatográfico foi mantido um fluxo constante de 38 mL/hora, coletando frações de 2 mL/tubo. A absorbância a 280 nm e a atividade hemaglutinante foram determinadas para cada tubo. A fração ativa (PII-Sephadex) foi dialisada contra água destilada, por 24 h, e liofilizada.

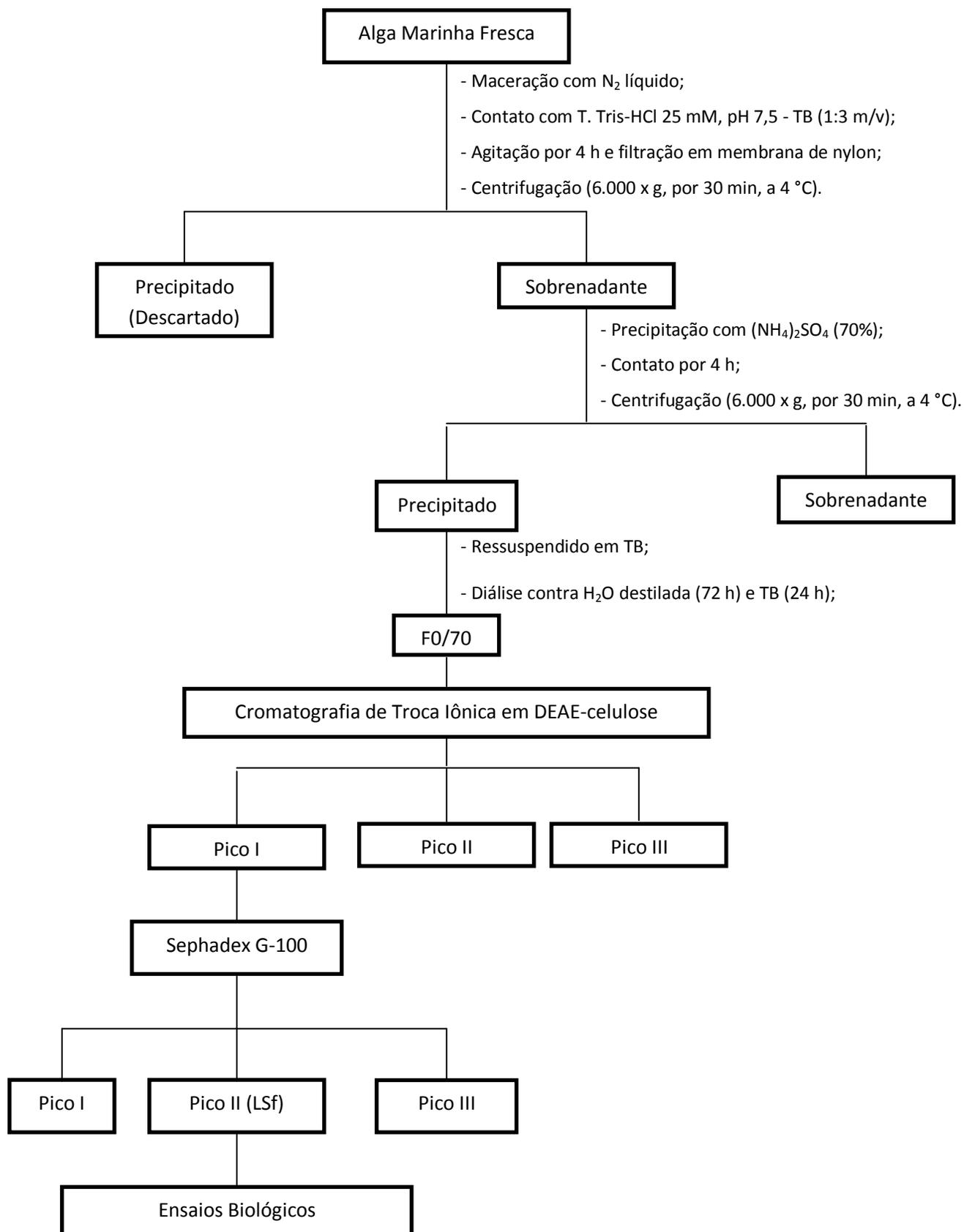
3.2.2 Determinação do Teor de Proteínas Totais

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 min de contato das amostras com o reagente Coomassie G-250, à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 595 nm (espectrofotômetro Armersham Biosciences Ultrospec 1100 pro). A concentração do teor de proteínas totais foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA). Para a estimativa das concentrações de proteínas nos eluatos das cromatografias foi utilizada a leitura de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro.

3.2.3 Determinação da Atividade Hemaglutinante

Os ensaios de atividade hemaglutinante das frações protéicas obtidas foram realizados através de diluições seriadas em tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 100 µL de NaCl 0,15 M. No primeiro tubo foram adicionados 100 µL 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 µL de uma suspensão de eritrócitos de coelho tratados com tripsina (2%) e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos, conforme descrito por Ainouz *et al.* (1992). Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 2.000 x g por 30 s e os resultados foram lidos macroscopicamente, sendo o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH/mL), que é o inverso da maior diluição da amostra que apresentou nítida aglutinação.

Figura 5 - Esquema de Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Vermelha *Solieria filiformis* (LSf).



3.2.4 Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida

O grau de pureza das frações com atividade hemaglutinante foi acompanhado por eletroforese em condições desnaturantes (PAGE-SDS) em gel de poliacrilamida a 15%, na presença e na ausência de β -mercaptoetanol, segundo o método de Laemilli descrito por Hames & Rickwood (1983).

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; GOULD; ROJAS-GALICIA, 1986). Os marcadores de migração eletroforética empregados foram: albumina sérica bovina (66,0 kDa); ovoalbumina (45,0 kDa); anidrase carbônica (29,0 kDa); inibidor de tripsina (20,0 kDa); e α -lactoalbumina (14,2 kDa).

3.2.5 Eletroforese Bidimensional

Para eletroforese bidimensional, primeiramente, as proteínas foram separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI), através da focalização isoelétrica (IEF), usando o sistema Ettan IPGphor II (Amershan Bioscience). Foram utilizadas fitas de gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida (IPG) de 13 cm, pH 3-10. As amostras foram solubilizadas em solução de reidratação (uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 65 mM, triton-X100 1%, tampão IPG 0,5% e azul de bromofenol) e aplicadas nas fitas, que foram reidratadas passivamente durante 16 h em cubas de reidratação “Reswelling Tray” (Pharmacia Biotech). Após isso, foram submetidas ao processo de separação utilizando o programa: 200 V por 2 h; 500 V por 2 h; 5000 V por 2 h; e 10000 V até atingir 20000 Volts/hora totais do procedimento de focalização isoelétrica, a 20 °C.

Após a focalização isoelétrica, as fitas foram equilibradas sob agitação em solução de equilíbrio e redução (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, glicerol 30%, uréia 6 M, SDS 2%, DTT 2% e azul de bromofenol) por 15 min, sob agitação lenta. Em seguida, lavadas com uma solução de alquilação (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, glicerol 30%, uréia 6 M, SDS 2%, iodoacetamida 2,5% e azul de bromofenol) por 15 minutos, também sob leve agitação.

A PAGE-SDS foi realizada em gel vertical homogêneo (14 x 14 cm). A fita foi inserida sobre o gel de poliacrilamida e fixada com uma solução de 0,5% de agarose. A separação

das proteínas, de acordo com suas massas moleculares, foi realizada a 12 °C, tendo sido alimentada por uma fonte Power-Pac 3000 (Bio-Rad). A corrida transcorreu em duas etapas: na primeira, foi aplicada corrente de 20 mA/gel, durante 20 minutos, e, na segunda, 30 mA/gel até o final da corrida eletroforética (aproximadamente 5 h).

As proteínas foram visualizadas através do coramento com *Comassie Brilliant Blue* coloidal (CANDIANO *et al.*, 2004). As imagens dos géis com as proteínas coradas foram obtidas através do ImageScanner (Amersham Biosciences) e analisadas pelo programa LabScan v. 5.0 (GE-Healthcare). Para a estimativa dos pontos isoelétricos e da massas moleculares dos *spots*, foi utilizado o programa ImageMaster 2D Platinum 5.0 (GE-Healthcare).

3.2.6 Sequenciamento dos Aminoácidos da Extremidade Aminoterminal (NH₂-terminal) da LSf

A sequência de aminoácidos NH₂-terminal da LSf foi determinada de acordo com o método de degradação de Edman. A lectina liofilizada foi dissolvida em água ultrapura e aplicada no sequenciador automático de proteínas (Shimadzu, modelo PPSQ-23A), sob as condições recomendadas pelo fabricante. A sequência obtida foi comparada àquelas depositadas no banco de dados NCBI, por meio do pacote de algoritmos de busca BLAST - protein blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

3.2.7 Avaliação do Efeito da LSf na Nocicepção em Camundongos

Para os ensaios de nocicepção, foram utilizados camundongos *Swiss* machos distribuídos em grupos de seis. Os animais receberam os seguintes tratamentos antes dos estímulos nociceptivos (ácido acético, formalina e placa quente): LSf (1, 3 ou 9 mg/kg; i.v.; 30 min), solução fisiológica estéril como controle negativo (NaCl 0,9%; i.v.; 30 min), indometacina, um anti-inflamatório não-esteroidal, e morfina, um agonista opióide, como controles positivos (5 mg/kg; s.c.; 1 h).

Na avaliação da importância da estrutura tridimensional da LSf sobre o possível efeito antinociceptivo, foi realizada a sua inativação térmica (desnaturação). Para tanto, a LSf na

dose de 1 mg/kg foi submetida ao aquecimento (90 °C; 30 min) e aplicada por via i.v. nos animais 30 min antes do estímulo.

A análise da importância do domínio lectínico da LSf no possível efeito antinociceptivo, foi realizada através da incubação da LSf (1 mg/kg) com o seu hapteno manana (39 mg/L) durante 12 h à 37 °C e aplicação por via i.v. nos animais 30 min antes do estímulo. Para descartar um possível efeito da glicoproteína manana sobre a nocicepção, esta também foi aplicada (39 mg/L) isoladamente 30 min antes do estímulo.

3.2.7.1 Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é um modelo clássico de nocicepção periférica em que, após a injeção intraperitoneal do agente nociceptivo, observam-se as respostas, que consistem em uma sequência de contorções no abdômen acompanhadas por extensão dos membros inferiores. As contorções abdominais foram induzidas por ácido acético 0,8% (i.p.), segundo o método descrito por Koster *et al.* (1959). Após administração do ácido acético, o número de contorções foi registrado durante 30 minutos.

3.2.7.2 Teste da Formalina

O teste da formalina foi desenvolvido por Dubuisson e Dennis (1977), sendo adaptado também ao longo dos anos. O modelo consiste na injeção intraplantar de formalina, que causa a estimulação de nociceptores, induzindo no animal comportamentos típicos como lambar, e/ou morder a pata injetada. Esse teste caracteriza-se por apresentar resposta bifásica distinta, sendo a primeira fase considerada neurogênica e a segunda, inflamatória, em resposta ao estímulo químico (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Após a injeção de formalina (2% v/v; 20 µL/pata) na pata traseira direita do animal, foi registrado o tempo, em segundos, gasto pelo animal lambendo a pata durante dois períodos: de 0-5 min (fase neurogênica) e de 20-25 min (fase inflamatória).

3.2.7.3 Teste da Placa Quente

A atividade analgésica central foi avaliada pelo teste da placa quente, segundo o método de Eddy e Leimbach (1953), que consiste em registrar o tempo, em segundos, que os animais, quando em contato com uma placa de metal aquecida (51 ± 1 °C), levam para manifestar uma resposta, que corresponde ao ato de retirar ou lambe a pata traseira e/ou saltar. Este teste é específico para verificar a nocicepção central.

Os animais, primeiramente, foram familiarizados com a placa quente, para a observação do tempo de reação controle. Os animais que apresentaram um tempo de reação superior a 10 s foram descartados do teste. As respostas ao estímulo térmico foram registradas nos intervalos de 30, 60 e 90 min após os tratamentos, sendo o tempo de reação observado por no máximo 40 s em cada intervalo.

3.2.8 Avaliação do Efeito da LSf na Inflamação Aguda em Ratos

3.2.8.1 Atividade Anti-inflamatória da LSf

Os ensaios de inibição da inflamação foram realizados utilizando ratos em grupos de seis. Os animais receberam os seguintes tratamentos antes do estímulo inflamatório: LSf (1, 3 ou 9 mg/kg; i.v.; 30 min), solução fisiológica estéril como controle negativo (NaCl 0,9%; i.v.; 30 min) e dexametasona, um glicocorticoide, como controle positivos (1 mg/kg; s.c.; 1 h).

Na avaliação da importância da estrutura tridimensional da LSf sobre o possível efeito anti-inflamatório, foi realizada a sua inativação térmica (desnaturação). Para tanto, a LSf na dose de 1 mg/kg foi submetida ao aquecimento (90 °C; 30 min) e aplicada por via i.v. nos animais 30 min antes do estímulo.

A análise da importância do domínio lectínico da LSf no possível efeito anti-inflamatório, foi realizada através da incubação da LSf (1 mg/kg) com o seu hapteno manana (39 mg/L) durante 12 h à 37 °C e aplicação por via i.v. nos animais 30 min antes do estímulo. Para descartar um possível efeito da glicoproteína manana sobre a inflamação, esta também foi aplicada (39 mg/L) isoladamente 30 min antes do estímulo.

3.2.8.1.1 Ensaio de Migração Celular Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Ratos (Peritonite)

Para avaliar o efeito anti-inflamatório da LSf na peritonite induzida por carragenana, os ratos receberam por via intraperitoneal (i.p.) o estímulo inflamatório Cg (700 µg/cavidade) dissolvida em 1 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). Após 4 horas da injeção de Cg, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, o líquido da cavidade peritoneal foi coletado através de uma lavagem, por injeção i.p. de 10 mL de salina (NaCl 0,9%), contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados e através de uma incisão foram recuperados entre 7 e 10 mL de fluido peritoneal, com pipeta Pasteur plástica. Como controle, um grupo adicional recebeu apenas solução salina 0,9% (i.p.).

As contagens total e diferencial dos leucócitos foram realizadas conforme metodologia descrita anteriormente por Souza e Ferreira (1985). Neste procedimento, 20 µL do fluido coletado de cada animal foram diluídos em 380 µL do reagente de Turk e posteriormente usados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada através de esfregaços corados em lâminas. Para tanto, 200 µL do exsudato foram centrifugados em citocentrífuga (400 x g, por 10 min). Após a centrifugação, 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. Alíquotas dos fluidos peritoneais foram armazenadas (-80 °C), para a posterior dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO).

3.2.8.1.2 Ensaio de Edema de Pata Induzido por Carragenana

O edema de pata induzido por carragenana (Cg) foi realizado segundo o método de Winter *et al.* (1962). A Cg (700 µg/pata) foi administrada por via intraplantar (i.pl.) na pata direita traseira (0,1 mL/100 g de peso corpóreo). Um grupo adicional recebeu apenas solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%; i.pl.). Os volumes da pata de cada animal foram medidos através de hidropletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 min, 1, 2, 3, 4 e 5 h após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pela pata no tempo zero e em um determinado

tempo após o estímulo. Ao término do ensaio, os animais foram eutanasiados com cloral hidratado (20%) e a porção inferior da pata foi extraída e armazenada (-80 °C) para a posterior dosagem da atividade da MPO. Os resultados foram expressos como a variação do volume da pata (mL), calculado como a diferença do volume basal (tempo zero).

a) Análise do Envolvimento da Via da Hemoxigenase (HO-1) na Atividade Anti-inflamatória da LSf

A análise do envolvimento da via da hemoxigenase (HO-1) na atividade anti-inflamatória da LSf foi realizada segundo a metodologia descrita por Freitas *et al.* (2006), com algumas modificações. Ratos foram pré-tratados com zinco protoporfirina (ZnPP) IX (3 mg/kg; s.c.), passados 60 minutos, foram, então, tratados com LSf (1 mg/kg; i.v.). Após 30 min, a carragenana (700 µg/pata; 0,1 mL/100 g de peso corpóreo; i.pl.) foi injetada. Um grupo adicional recebeu apenas solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%; i.pl.). Os volumes da pata de cada animal foram medidos através de hidropletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 min, 1, 2, 3, 4 e 5 h após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pela pata no tempo zero e em um determinado tempo após o estímulo. Os resultados foram expressos como a variação do volume da pata (mL), calculado como a diferença do volume basal (tempo zero).

3.2.8.1.3 Ensaio de Edema de Pata Induzido por Dextrano

O modelo do edema de pata induzido por dextrano foi realizado segundo Maity *et al.* (1998). O dextrano (500 µg/pata) foi administrado por via i.pl. (0,1 mL/100 g de peso corpóreo). Um grupo adicional recebeu apenas solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%; i.pl.). Os volumes da pata direita traseira de cada animal foram medidos através de hidropletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 min, 1, 2, 3 e 4 h após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pela pata no tempo zero e em um determinado tempo após o estímulo. Os resultados foram expressos como a variação do volume da pata (mL), calculado como a diferença do volume basal (tempo zero).

3.2.8.2 Avaliação do Efeito Edematogênico da LSf

3.2.8.2.1 Ensaio de Edema de Pata Induzido por LSf

Para avaliar o possível efeito edematogênico da LSf em ratos, LSf (1, 3 ou 9 mg/kg), foi injetada na pata posterior direita dos animais (0,1 mL/100 g de peso corpóreo; n=6). Como controle, um grupo adicional recebeu apenas solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%; i.pl.). Os volumes da pata direita traseira de cada animal foram medidos através de hidropletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pela pata no tempo zero e em um determinado tempo após o estímulo. Ao término do ensaio, os animais foram eutanasiados com cloral hidratado (20%) e a porção inferior da pata foi extraída e armazenada (-80 °C) para a posterior dosagem da atividade da MPO. Os resultados foram expressos como a variação do volume da pata (mL), calculado como a diferença do volume basal (tempo zero).

3.2.8.2.2 Modulação Farmacológica da Atividade Edematogênica da LSf

A modulação farmacológica foi realizada para investigar quais mediadores inflamatórios estão envolvidos no efeito edematogênico da LSf, quando esta é aplicada diretamente na pata. Para isso, LSf (9 mg/kg; 0,1 mL/100 g de peso corpóreo) foi injetada na pata direita traseira dos ratos (n=6) 30 min ou 1 h após o tratamento com os seguintes fármacos: indometacina (5 mg/kg; s.c.; 1 h), dexametasona (1 mg/kg; s.c.; 1 h), pentoxifilina (90 mg/kg; s.c.; 1h), meclizina (40 mg/kg; s.c.; 1 h) ou L-NAME (30 mg/kg; i.v.; 30 min). Como controle, um grupo recebeu apenas solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%; i.pl.). Os volumes da pata direita traseira de cada animal foram medidos através de hidropletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h, após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pela pata no tempo zero e em um determinado tempo após o estímulo. Os

resultados foram expressos como a variação do volume da pata (mL), calculado como a diferença do volume basal (tempo zero).

3.2.8.2.3 Avaliação do Efeito da LSf (i.v.) sobre o Edema de Pata Induzido pela LSf (i.pl.)

Esse ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar um possível efeito anti-inflamatório da LSf (i.v.) sobre o edema de pata induzido pela referida lectina, quando injetada por via i.pl. na pata direita traseira de ratos.

Os animais (n=6/grupo) foram pré-tratados com a LSf (1, 3 e 9 mg/kg; 30 min) por via i.v. antes de receberem a LSf (9 mg/kg; 0,1 mL/100 g de peso corpóreo) por via i.pl. Como controle, um grupo recebeu apenas solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%; i.pl.). Os volumes da pata direita traseira de cada animal foram medidos através de hidropletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pela pata no tempo zero e em um determinado tempo após o estímulo. Os resultados foram expressos como a variação do volume da pata (mL), calculado como a diferença do volume basal (tempo zero).

3.2.8.3 Determinação da Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração dessas células nos processos inflamatórios. A determinação da atividade de MPO no tecido foi realizada segundo Bradley *et al.* (1982).

Para a dosagem das amostras de tecidos obtidos dos ensaios de edema de pata, 50 mg de tecido da pata foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio, utilizando um homegeneizador Polytron (dois ciclos de 10 s). Após isso, os homogeneizados foram centrifugados a 4000 x g, por 12 min, a 4 °C e os sobrenadantes, colhidos.

Alíquotas (7 µL) dos sobrenadantes obtidos dos tecidos das patas e dos fluidos peritoneais obtidos do ensaio de peritonite foram adicionadas ao tampão fosfato (200 µL)

contendo diidrocloreto de o-dianisidina 1 mM e peróxido de hidrogênio 0,0005% em microplaca de 96 poços. A absorbância foi medida a 450 nm em leitor de placa ELISA, tomando duas leituras em intervalos de 60 s. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio é degradado ocorre a produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianisidina em um composto de coloração marrom. Foi considerado que 1 unidade de MPO converte 1 μmol de H_2O_2 em 1 min a 22 °C causando uma mudança na absorção de $1,13 \times 10^{-2}$ nm/min. Os resultados foram expressos como unidades de MPO/mg de tecido ou unidades de MPO/mL de fluido peritoneal.

3.2.9 Avaliação da Toxicidade por Dose Repetida em Camundongos

Para a avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas da LSf, 9 mg/kg foram administrados, por via i.v., em camundongos machos e fêmeas (n=6), durante 7 dias consecutivos. Os animais foram observados até o oitavo dia, sendo mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular com livre acesso à água e ração. No oitavo 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, Aspartato Aminotransferase (AST/TGO) e Alanina Aminotransferase (ALT/TGP). Em seguida, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, seguido da retirada dos órgãos baço, timo, linfonodo, rim direito, fígado e coração, para posterior pesagem, mantendo correlações com as respectivas massas corpóreas, e análises histológicas.

Todos os parâmetros toxicológicos observados foram comparados aos de animais que receberam apenas solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e a animais que não receberam nenhum tratamento (grupo não tratado - NT), sendo, então, considerados grupos controles.

3.2.9.1 Análises Bioquímicas Enzimáticas do Plasma

3.2.9.1.1 Dosagem de Uréia

Essa metodologia baseia-se no princípio de que a uréia é hidrolisada pela urease a íons amônio e gás carbônico. Os íons amônio, então, reagem em pH alcalino com salicilato e

hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar o azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra.

Portanto, com a finalidade de observar possíveis alterações na função renal dos animais, após administração diária de LSf (9 mg/kg; i.v.) durante 7 dias, obtiveram-se os plasmas a partir da centrifugação dos sangues totais coletados dos animais. 50 µL de plasma de cada animal foram utilizados para a dosagem de uréia, segundo a metodologia descrita no Kit da Labtest[®] (Cat. 27, ANVISA 10009010011), utilizando a absorvância de 600 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mg/dL.

3.2.9.1.2 Dosagem de Fosfatase Alcalina

Esta metodologia baseia-se no princípio de que a fosfatase alcalina do plasma hidrolisa a timolftaleína monofosfato, liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de fosfatase alcalina na amostra.

Essa dosagem foi realizada com a finalidade de observar possíveis alterações na função hepática dos animais, após a administração diária da LSf (9 mg/kg;i.v.) durante 7 dias. Para tal, 25 µL de plasma de cada animal foram utilizados para a dosagem, sendo esta realizada segundo a metodologia descrita no Kit da Labtest[®] (Cat. 40, ANVISA 10009010081). Os resultados foram expressos em UI/L.

3.2.9.1.3 Dosagens da Aspartato Aminotransferase (AST/TGO) e Alanina Aminotransferase (ALT/TGP)

As dosagens das enzimas AST e ALT necessitaram de 10 µL de plasma e foram realizadas de acordo com os Kits da Labtest[®] (Cat. 52 e 53, ANVISA 10009010031 e 10009010027, respectivamente), com o objetivo de detectar possíveis alterações hepáticas nos animais submetidos ao tratamento com a LSf (9 mg/kg;iv.) por 7 dias.

O procedimento para a dosagem da AST baseia-se na capacidade que essa enzima tem de promover a transferência de grupamentos amins de α -aminoácidos para α -cetoácidos. Assim, o oxaloacetato formado é medido através da formação de hidrazona, a qual tem intensa cor em meio alcalino.

A dosagem de ALT também baseia-se na capacidade que essa enzima tem de promover a transferência de grupamentos aminas de α -aminoácidos para α -cetoácidos. Porém, neste processo há a formação de piruvato, que é medido através da formação de hidrazona.

As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro a 505 nm e os resultados, expressos em UI/L.

3.2.9.2 Análises Histológicas dos Órgãos

Após pesagem, os órgãos retirados foram fixados com formalina 10% por 48 h, desidratados com concentrações crescentes de etanol absoluto (70 a 100%) e processados para inclusão em parafina. Os blocos resultantes foram, então, cortados em secções de 5 μ m de espessura, corados pelo método de Hematoxilina-Eosina e observados em microscopia óptica.

3.2.10 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm 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 $p < 0,05$.

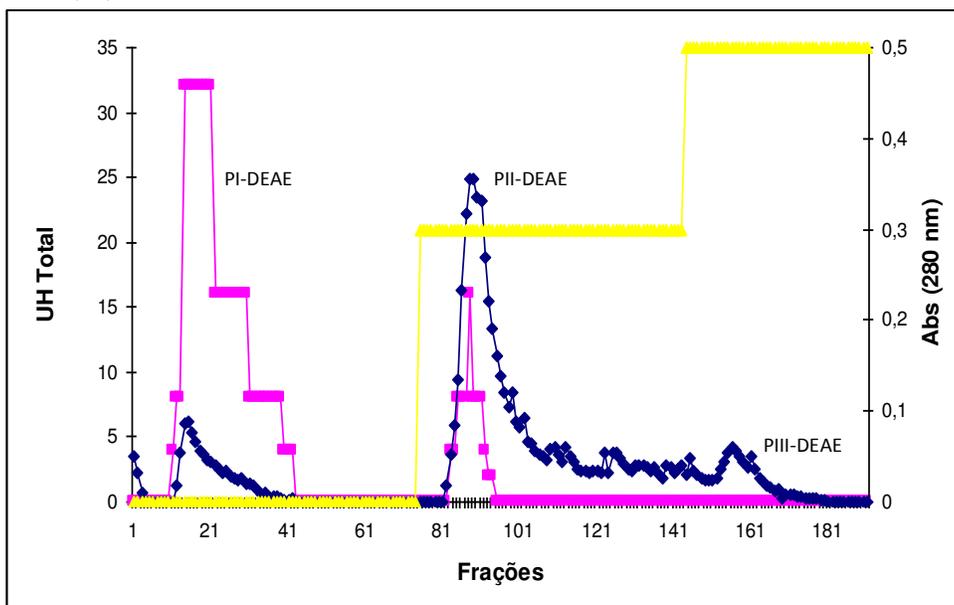
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação e Caracterização da Lectina da Alga Marinha Vermelha *Solieria filiformis*

4.1.1 Purificação da Lectina

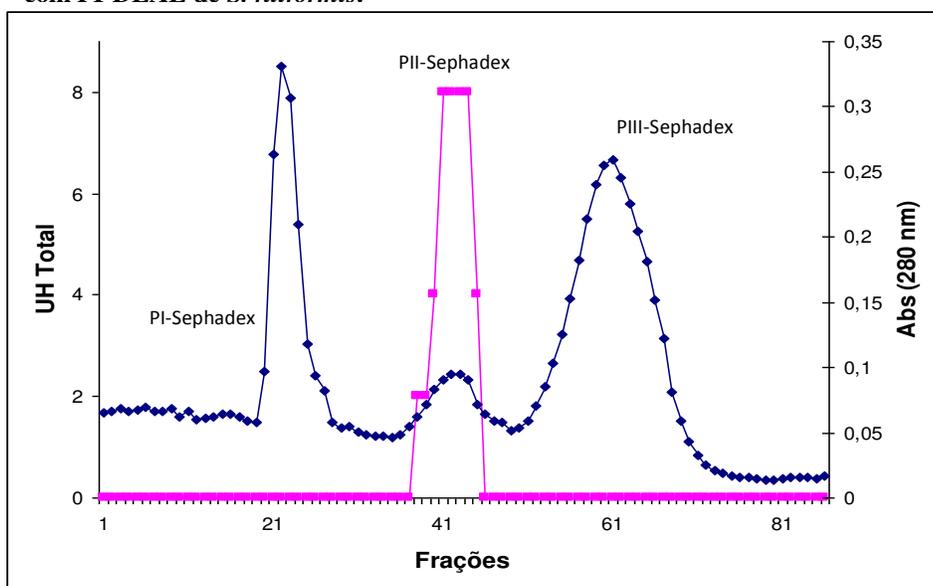
No procedimento de purificação da LSf por cromatografias sequenciais, a cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose mostrou a presença de três picos protéicos (FIGURA 6). O primeiro pico (PI-DEAE), eluído isocraticamente, apresentou-se livre de pigmentos e com atividade hemaglutinante; o segundo pico (PII-DEAE), eluído com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (TB) contendo NaCl 0,3 M, apresentou-se bastante pigmentado e com baixa atividade hemaglutinante; e o terceiro e último pico (PIII-DEAE), eluído com TB contendo NaCl 0,5 M, apresentou-se pouco pigmentado e livre de atividade hemaglutinante. Portanto, o PI-DEAE, por ter apresentado elevada atividade hemaglutinante e isento de pigmentos, após diálise contra água destilada e liofilização, foi aplicado em cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-100, que revelou a presença de três picos protéicos, onde o pico II (PII-Sephadex) encerrou toda a atividade hemaglutinante (FIGURA 7). Esse procedimento de purificação levou a um rendimento de 1,3% de lectina, partindo-se de 500 g de alga fresca (TABELA 1).

Figura 6 - Cromatografia de Troca Iônica em Gel de DEAE-celulose com F0/70 de *S. filiformis*.



As frações foram eluídas por “step wise” com tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,5 (TB) sem NaCl (PI-DEAE) e com NaCl 0,3 (PII-DEAE) e 0,5 M (PIII-DEAE). Frações: 5 mL/tubo. (◆◆) Absorbâncias a 280 nm; (□□) Atividade hemaglutinante total (UH Total), que é a maior diluição que ainda causa uma aglutinação visível; (▲▲) As concentrações de NaCl no TB (0; 0,3 e 0,5 M).

Figura 7 - Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sephadex G-100 com PI-DEAE de *S. filiformis*.



As frações foram eluídas com tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,5 (TB). Frações: 2 mL/tubo. (◆◆) Absorbâncias a 280 nm; (□□) Atividade hemaglutinante total (UH Total), que é a maior diluição que ainda causa uma aglutinação visível.

Tabela 1 - Purificação da Lectina da Alga Marinha Vermelha *Solieria filiformis* (LSf).

FRAÇÕES	PROTEÍNA TOTAL ^a (mg)	RENDIMENTO PROTÉICO (%)	ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE		CMA ^d ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)
			TOTAL ^b (U.H. mL ⁻¹)	ESPECÍFICA ^c (U.H. mg P ⁻¹)	
Extrato Total	333,33	100	76190,72	228,57	4,38
F0/70	196,71	59	82892,80	421,40	2,37
PI-DEAE	18,36	5,5	10491,12	571,41	1,75
PII- Sephadex	4,2	1,3	8400	2000	0,5

^a Obtida a partir de 500 g de alga;

^b Inverso da maior diluição que ainda causa aglutinação de eritrócitos de coelho tratados com tripsina (2%);

^c Unidades de hemaglutinação por mg de proteína;

^d Concentração mínima capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos tripsinizados de coelho (2%).

O procedimento cromatográfico de troca-iônica em gel de DEAE-celulose mostrou-se essencial para a retenção de pigmentos. Por isso, essa cromatografia tem sido bastante utilizada como um passo para a purificação de lectinas de algas.

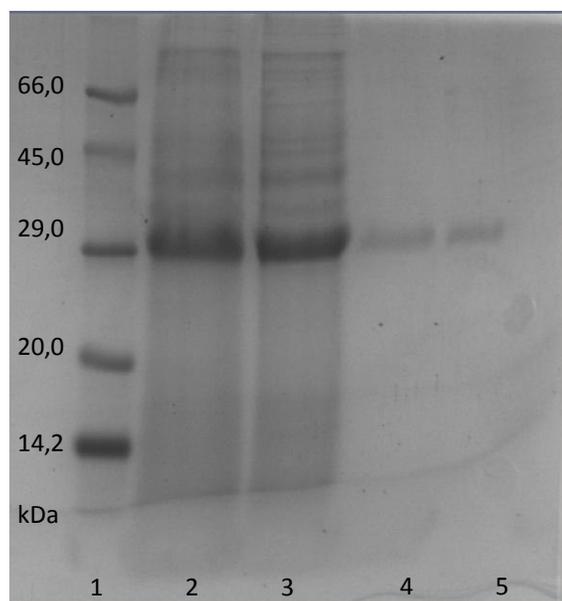
Benevides *et al.* (2001) purificaram a lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* através de cromatografia de troca-iônica em gel de DEAE-celulose, seguida de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100. A lectina da alga *Hypnea musciformis* também foi purificada por cromatografias sequenciais de troca iônica em gel de DEAE-celulose e de filtração em gel em Sephadex G-50 (NAGANO *et al.*, 2002).

O baixo rendimento lectínico (1,3%) obtido da purificação da LSf é comparável aos rendimentos obtidos para outras lectinas de algas marinhas. Como por exemplo, Melo *et al.* (2004), ao isolarem a lectina da alga marinha vermelha *Vidalia obtusiloba*, obtiveram um rendimento de 0,15%; Silva *et al.* (2010), ao purificarem a lectina da alga *Pterocladia capillacea*, obtiveram um rendimento de 3% e Lima *et al.* (2005), obtiveram um rendimento de 4,5%, na purificação da lectina da alga *Gracilaria cornea*. Todas essas lectinas também foram purificadas de extratos protéicos a partir de 500 g de alga.

4.1.2 Eletroforeses Unidimensional e Bidimensional

Para acompanhar o grau de pureza das frações PI-DEAE e PII-Sephadex, estas foram submetidas ao procedimento de eletroforese desnaturante (PAGE-SDS), na presença e na ausência de β -mercaptoetanol (FIGURA 8). A fração PI-DEAE, quando avaliada na presença e ausência de β -mercaptoetanol, apresentou várias bandas protéicas, enquanto a fração PII-Sephadex apresentou uma única banda protéica de massa molecular de aproximadamente 29 kDa, sugerindo que a lectina está pura e é considerada monomérica, tendo sido, então, denominada de LSf.

Figura 8 - PAGE-SDS das Frações PI-DEAE e PII-Sephadex da Alga Marinha Vermelha *S. filiformis*.

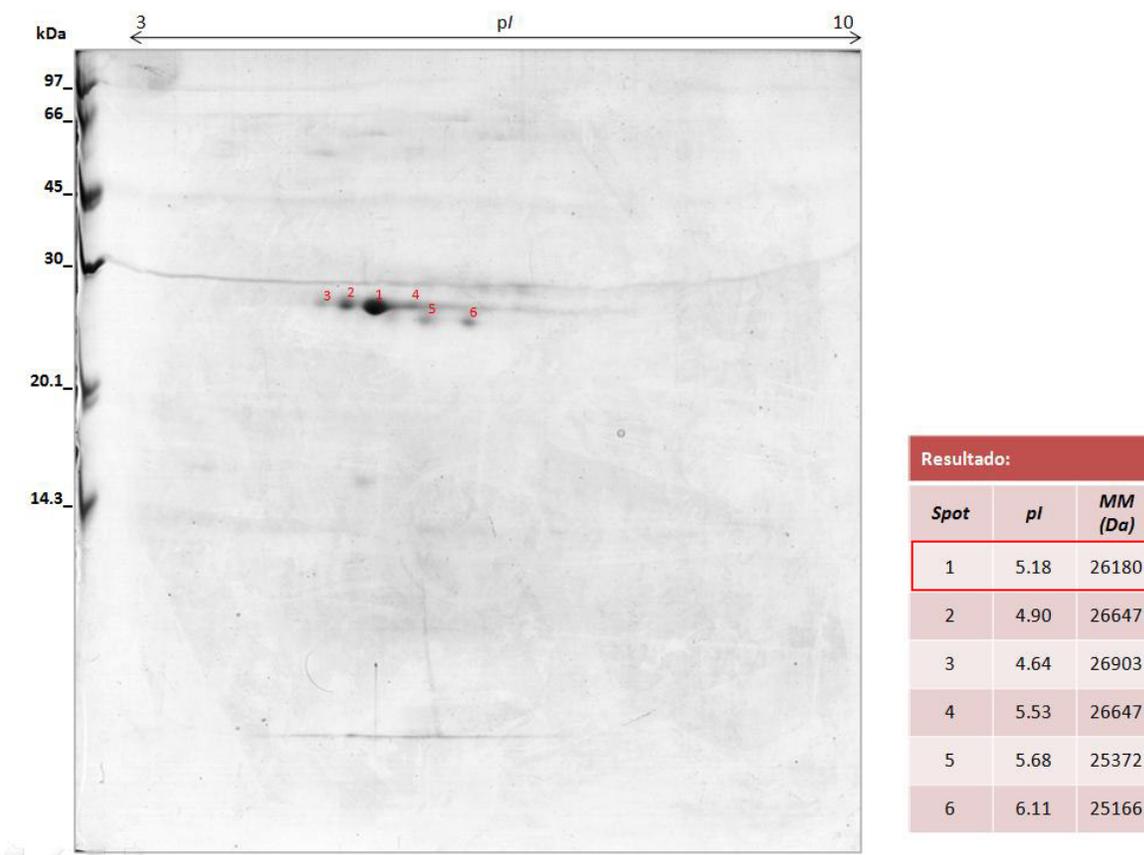


1. Marcadores; 2. PI-DEAE na ausência de β -mercaptoetanol; 3. PI-DEAE na presença de β -mercaptoetanol; 4. PII-Sephadex na ausência de β -mercaptoetanol; e 5. PII-Sephadex na presença de β -mercaptoetanol.

Na avaliação do *pI* da LSf por eletroforese bidimensional, foram observados seis *spots* com massas moleculares e pontos isoelétricos distintos (FIGURA 9), sugerindo que a LSf possui 6 isoformas (formas diferentes da mesma proteína), com a isoforma mais abundante (*spot*

1) com massa molecular (MM) de 26,18 kDa, apresentando um pI de 5,18. Esse valor da MM confirmou o valor obtido pela eletroforese unidimensional, que foi de, aproximadamente, 29 kDa.

Figura 9 - Eletroforese Bidimensional da Lectina da Alga Marinha Vermelha *S. filiformis*.



Os marcadores de massa molecular utilizados estão assinalados à esquerda do gel de poliacrilamida. As amostras foram submetidas à focalização isoelétrica em tiras de 13 cm com gradiente de pH de 3 – 10 e o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue Coloidal. A análise das imagens foi feita pelo programa ImageMaster 2D Platinum 5.0, que estimou os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada *spot*. pI : ponto isoelétrico; MM: massa molecular (Da).

Portanto, a massa molecular de 26,18 kDa obtida para a LSf corrobora com os resultados obtidos por Benevides *et al.* (1996), que mostraram que essa lectina tem massa molecular aparente de 29 kDa. Em geral, as lectinas das algas marinhas são monoméricas e apresentam baixas massas moleculares (ROGERS & HORI, 1993). Como exemplos têm-se as

lectinas das algas *Amansia multifida* e *Solieria robusta*, que, por PAGE-SDS, apresentaram massas moleculares aparentes de 14,2 e 29,0 kDa, respectivamente (COSTA *et al.*, 1999; HORI *et al.*, 2007).

O baixo valor do *pI* apresentado pela LSf (5,18) confirma a análise da composição de aminoácidos feita por Benevides *et al.* (1996). Nesse estudo, os autores concluíram que essa lectina tem alto teor de aminoácidos ácidos e hidroxilados e baixo teor de aminoácidos básicos. Como mencionado anteriormente, as lectinas de algas marinhas, usualmente, são ricas em aminoácidos ácidos e hidroxilados e pobres em aminoácidos básicos, assim, o ponto isoelétrico dessas proteínas, geralmente, é baixo (HORI; MIYAZAWA; ITO, 1990). As lectinas obtidas de outras espécies de algas, tais como *Gracilaria cornea*, *E. serra*, *G. ornata* e *S. robusta* também apresentaram *pI* ácidos de 4,30; 4,95; 5,40 e 4,30, respectivamente (LIMA *et al.*, 2005; SUGAWARA *et al.*, 2001; LEITE *et al.*, 2005; HORI *et al.*, 1988).

4.1.3 Sequenciamento dos Aminoácidos da Extremidade Amino-terminal (NH₂-terminal) da LSf

Na determinação do sequenciamento de resíduos de aminoácidos da extremidade amino-terminal da proteína LSf, foi observada a presença de 37 resíduos que apresentaram a seguinte sequência: **ARYTVQNQWGGSSAPWNDAGLWVLGSRGNQNVMAVDV**. Após o alinhamento dessa extremidade NH₂-terminal com sequências protéicas não redundantes através do algoritmo BLASTp, foi observado que LSf apresenta identidade com 12 diferentes proteínas (FIGURA 10). Entretanto, a proteína que mais apresentou identidade com a sequência NH₂-terminal obtida para a LSf foi a lectina da alga marinha vermelha *Eucheuma serra* (ESA). Essas duas proteínas apresentaram 95% de identidade nas suas extremidades NH₂-terminal, diferindo apenas nas posições de dois resíduos de aminoácidos. Na posição 1, a LSf apresenta o aminoácido alanina, enquanto que a ESA, glicina, e, na posição 23, a LSf apresenta o resíduo valina e a ESA, isoleucina (FIGURA 11).

Figura 10 - Alinhamentos Encontrados para a Sequência NH₂-terminal da LSf.

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [G](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
P84331.1	RecName: Full=Lectin ESA-2	75.9	230	100%	1e-22	95%	
AAM93971.1	short-chain alcohol dehydrogenase family enzyme [Griffithsia tenuis]	22.7	22.7	70%	0.002	50%	
NP_049298.1	orf284 [Porphyra purpurea] >gb AAD03101.1 orf284 [Porphyra purpurea]	20.8	20.8	35%	0.009	62%	G
NP_045120.1	cytochrome b6 [Cyanidium caldarium] >sp Q9TLZ7.1 CYB6_1	20.8	20.8	32%	0.010	50%	G
NP_849013.1	cytochrome b6 [Cyanidioschyzon merolae strain 10D] >sp Q9TLZ7.1 CYB6_1	20.8	20.8	32%	0.011	50%	G
NP_045101.1	acetoxyacid synthase large subunit [Cyanidium caldarium]	20.4	20.4	45%	0.013	35%	G
YP_537022.1	cytochrome b6 [Pyropia yezoensis] >sp Q1XDE6.1 CYB6_1	20.4	20.4	37%	0.014	43%	G
YP_063557.1	cytochrome b6 [Gracilaria tenuistipitata var. liui] >sp Q61111.1 CYB6_1	20.4	20.4	37%	0.014	43%	G
NP_053951.1	cytochrome b6 [Porphyra purpurea] >sp P51341.1 CYB6_1	20.4	20.4	37%	0.014	43%	G
NP_052233.1	hypothetical protein [Gracilariopsis lemaneiformis] >gb AA03101.1	20.0	20.0	91%	0.018	32%	G
ACF72679.1	putative hexose phosphate translocator [Galdieria sulphuraria]	20.0	20.0	32%	0.018	67%	
NP_045104.1	O-succinylbenzoic acid-CoA ligase [Cyanidium caldarium]	18.9	18.9	72%	0.051	33%	G

A sequência NH₂-terminal da LSf obtida foi comparada àquelas depositadas no banco de dados NCBI, por meio do pacote de algoritmos de busca BLAST - protein blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

Figura 11 - Alinhamento do NH₂-terminal da LSf com o NH₂-terminal da Lectina da *E. serra*.

[sp|P84331.1|LEC1_EUCSE](#) RecName: Full=Lectin ESA-2
Length=268

Sort alignments for this subject sequence by:
[E value](#) [Score](#) [Percent identity](#)
[Query start position](#) [Subject start position](#)

Score = 75.9 bits (185), Expect = 2e-16, Method: Compositional matrix adjust.

Identities = 35/37 (95%), Positives = 36/37 (97%), Gaps = 0/37 (0%)

<u>Query_1</u>	ARYTVQNQWGGSSAPWNDAGLWV LGSRGNQNVMAVDV	37
	RYTVQNQWGGSSAPWNDAGLW+LGSRGNQNVMAVDV	
<u>Sbjct_1</u>	GRYTVQNQWGGSSAPWNDAGLW LGSRGNQNVMAVDV	37

Query 1: sequência da LSf; Sbjct 1: sequência da *E. serra*. Os aminoácidos idênticos entre as duas sequências estão marcados em amarelo. (NCBI; BLASTp).

A alga marinha *E. serra* é uma alga vermelha que pertence à mesma família da *S. filiformis* (Solieriaceae). A ESA possui massa molecular de 27,9 kDa, e, semelhantemente à LSf, é monomérica, possui maior conteúdo de aminoácidos ácidos (pI de 4,95), reconhece e é inibida por manana (HORI *et al.*, 1988; 2007). Em relação às suas atividades biológicas, a ESA possui atividade mitogênica para linfócitos humanos e murinos, inibe o crescimento *in vitro* de células tumorais e tem atividade bactericida (KAWAKUBO *et al.*, 1997; SUGAWARA *et al.*, 2000; LIAO *et al.*, 2003).

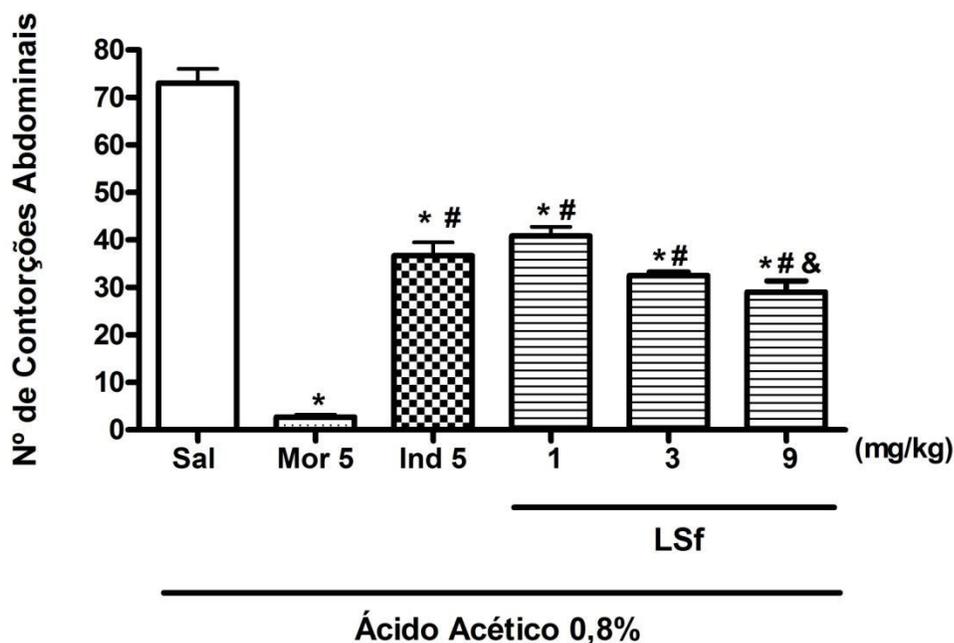
4.2 Avaliação do Efeito da LSf na Nocicepção em Camundongos

4.2.1 Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

O ácido acético injetado intraperitonealmente provoca a liberação de mediadores inflamatórios, tais como bradicinina, substância P, eicosanóides, aminas simpatomiméticas e várias citocinas, incluindo IL-1 β , TNF- α e IL-8, que são liberadas por mastócitos e macrófagos residentes (RIBEIRO *et al.*, 2000). Além disso, também pode ativar diretamente canais de cátions não-seletivos localizados na via aferente primária (JULIUS; BASBAUM, 2001). O resultado é uma inflamação aguda no peritônio com aumento da permeabilidade vascular, irritação peritoneal e dor aguda, que faz o animal responder através de contorções abdominais, redução e incoordenação da atividade motora (BRAGGIO *et al.*, 2002).

A LSf nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg (i.v.) foi capaz de reduzir, significativamente, o número de contorções induzidas por ácido acético em 44,1; 55,5 e 60,3%, respectivamente, quando comparada ao controle salina. Os tratamentos com morfina e indometacina (5 mg/kg;s.c.), utilizados como controles positivos, reduziram os números de contorções em 96,3 e 49,8%, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as doses de LSf e o controle indometacina (FIGURA 12).

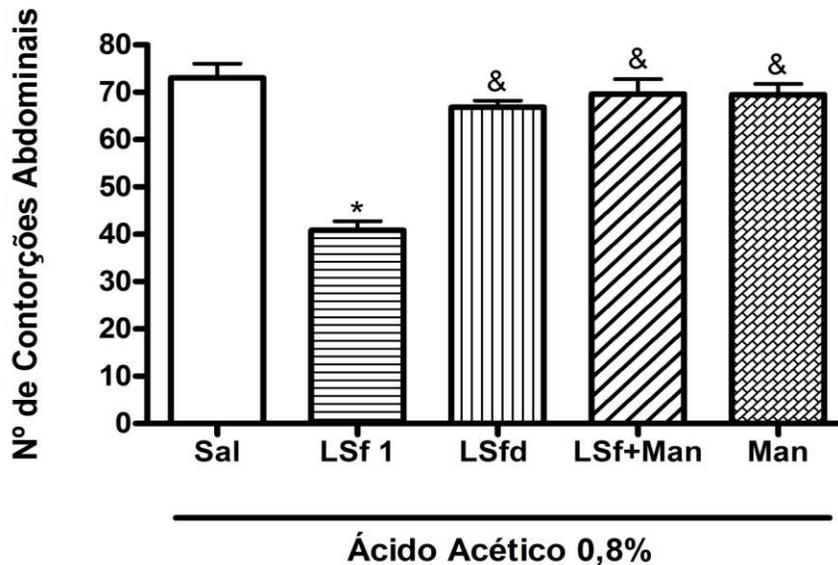
Figura 12 - Efeito da LSf no Modelo de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético em Camundongos.



Os animais (6/grupo) foram tratados 30 min antes do ácido acético (0,8%;i.p.) com LSf (1, 3 e 9 mg/kg;i.v.) e sal (NaCl 0,9%;i.v.); e, 1 h antes, com morfina e indometacina (5 mg/kg;s.c.). As barras representam a média ± E.P.M. do número de contorções. * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao controle negativo Sal; # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo Mor 5; e & $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LSf 1. (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Quando desnaturada (90 °C; 30 min), a LSf perdeu sua capacidade de reduzir o número de contorções abdominais. Esses resultados mostram a importância da estrutura tridimensional da proteína na sua atividade analgésica. Esse mesmo comportamento também foi observado quando a LSf (1 mg/kg) foi avaliada em associação ao seu açúcar ligante manana (39 mg/L). Vale salientar que a administração da manana isoladamente (39 mg/L) não foi capaz de ocasionar a redução das contorções abdominais. Esse resultado comprova que o sítio lectínico de ligação à manana é essencial para a atividade antinociceptiva da LSf (FIGURA 13).

Figura 13 - Efeito da LSf Desnaturada ou Associada com Manana no Modelo de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético em Camundongos.



Os animais (6/grupo) foram tratados 30 min antes da aplicação do ácido acético (0,8%;i.p.) com NaCl 0,9% (i.v.) – Sal; LSf (1mg/kg; i.v.) - LSf 1; LSf (1 mg/kg;i.v.) desnaturada (90 °C/30 min) – LSfd; LSf (1 mg/kg) associada ao seu ligante manana (39 mg/L) i.v. – LSf+Man; e manana (39 mg/L;i.v.) - Man. As barras representam a média \pm E.P.M. do número de contorções. * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao controle negativo Sal; e & $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LSf 1. (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Esse efeito antinociceptivo da LSf corrobora com os resultados obtidos com outras lectinas de algas marinhas. A lectina da alga *Bryothamnion triquetrum*, nas doses de 1 e 5 mg/kg, quando administrada por via oral (v.o.), inibiu as contorções abdominais induzidas por ácido acético em 65 e 78%, respectivamente (VIANA *et. al.*, 2002).

Silva *et al.* (2010) mostraram que a lectina da alga *Pterocladia capillacea*, nas doses de 0,9; 8,1 e 72,9 mg/kg (via i.v.), foi capaz de inibir essas contorções em 30,0; 39,0 e 52,0%, respectivamente. A ação antinociceptiva dessa lectina também foi revertida quando a mesma foi termicamente desnaturada ou associada ao seu hapteno (mucina), corroborando com os dados obtidos neste trabalho.

O ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético é considerado um modelo clássico para estudos de avaliação da dor de origem inflamatória. Apesar de ser pouco específico, tem boa sensibilidade e é considerado como uma ferramenta de triagem para avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória, por sua simplicidade de execução

(WHITTLE, 1994). Esse modelo tem sido muito utilizado para avaliar o potencial analgésico de novos inibidores das COXs, uma vez que existe um consenso de que os principais mediadores que orquestram a nocicepção nesse teste são os que induzem a síntese das COXs (MATSUMOTO *et al.*, 1998).

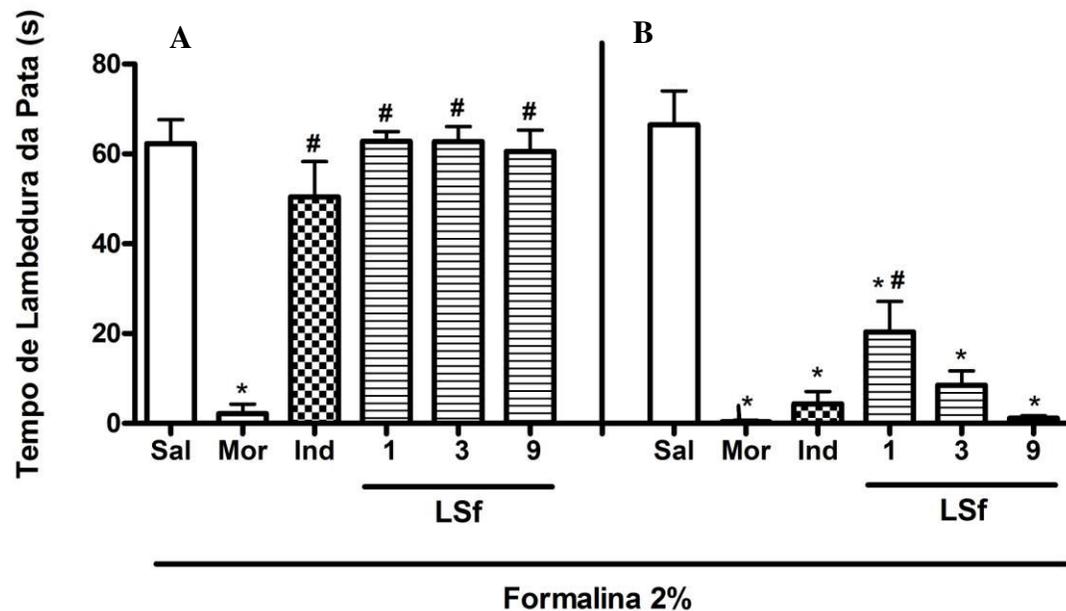
Assim, o resultado obtido no presente estudo sugere que o efeito antinociceptivo da LSf pode estar relacionado à inibição da liberação de mediadores inflamatórios, principalmente das COXs, e à inibição da migração de células que provocariam o processo doloroso. Porém, como esse modelo é inespecífico, realizou-se o Teste da Formalina, com a finalidade de melhor averiguar o efeito analgésico dessa lectina.

4.2.2 Teste da Formalina

O teste da formalina é um modelo de dor persistente amplamente utilizado, sendo bastante importante para o desenvolvimento de novos agentes para o tratamento de dor pós-operatória (SHIELDS *et al.*, 2010). Além disso, é considerado como o modelo que mais se aproxima da dor clínica (TJØLSEN; HOLE, 1997).

Na primeira fase desse teste, a LSf não reduziu o tempo de lambedura da pata em nenhuma das doses administradas. Porém, na segunda fase, a LSf nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg (i.v.) reduziu significativamente esse tempo em 69,5; 87,2 e 98,2%, respectivamente, quando comparada ao controle salina, entretanto, não houve diferença significativa entre as doses testadas. Com relação ao controle positivo morfina (5 mg/kg;s.c.), esta reduziu o tempo de lambedura tanto na primeira fase (96,5%), quanto na segunda (100,0%). Já a indometacina, considerada outro controle positivo, reduziu esse tempo apenas na segunda fase, em 93,5%. Não houve diferença significativa entre a LSf e o controle indometacina (FIGURA 14).

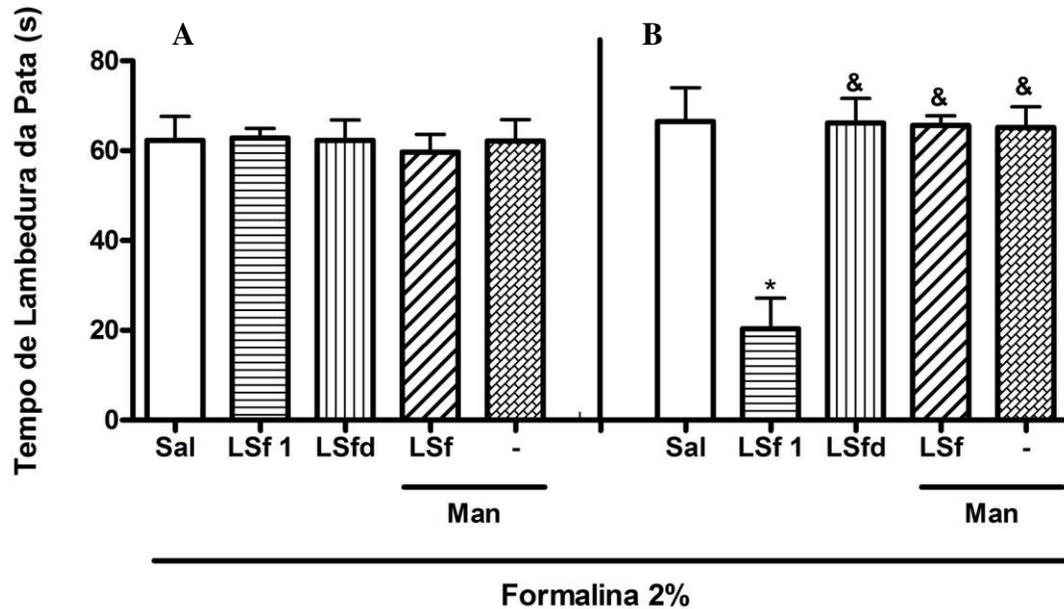
Figura 14 - Efeito da LSf no Teste da Formalina a 2%.



Os animais (n=6) foram tratados 30 min antes da aplicação intraplantar de formalina 2% com salina (NaCl 0,9%;i.v.) – Sal; e LSf (1, 3 e 9 mg/kg; i.v.); e, 1 h antes, com morfina – Mor - e indometacina – Ind (5 mg/kg;s.c.). Após a administração da formalina, o tempo de lambedura (s) foi registrado nos primeiros 5 min (1ª fase – painel A) e de 20 a 25 min (2ª fase- painel B). As barras representam a média ± E.P.M. do tempo de lambedura da pata. * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao controle negativo Sal; e # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo Mor. (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Quando desnaturada (90 °C; 30 min) ou associada ao seu açúcar ligante manana (39 mg/L), a LSf (1 mg/kg) perdeu completamente sua capacidade de reduzir o tempo de lambedura da pata na segunda fase. Vale ressaltar ainda que a administração da manana isoladamente (39 mg/L) também não reduziu o tempo de lambedura em nenhuma das fases (FIGURA 15).

Figura 15 - Efeito da LSf Desnaturada ou Associada com Manana no Teste da Formalina a 2% em Camundongos.



Os animais (n=6) foram tratados 30 min antes da aplicação intraplantar de formalina 2% com salina (NaCl 0,9%;i.v.) – Sal; LSf (1mg/kg; i.v.) - LSf 1; LSf (1 mg/kg;i.v.) desnaturada (90 °C/30 min) – LSfd; LSf (1 mg/kg) associada ao seu ligante manana (39 mg/L) i.v. – LSf+Man; e manana (39 mg/L;i.v.) – Man. Após a administração da formalina, o tempo de lambedura (s) foi registrado nos primeiros 5 min (1ª fase – painel A) e de 20 a 25 min (2ª fase- painel B). As barras representam a média ± E.P.M. do tempo de lambedura da pata (s). * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao controle negativo Sal; e & $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LSf 1. (ANOVA; Teste de Bonferroni).

No teste da formalina, a primeira fase é caracterizada por dor neurogênica, envolvendo a estimulação direta de nociceptores e das fibras aferentes mielinizadas e não mielinizadas, principalmente a fibra C, e a liberação de substância P. Enquanto que a segunda fase (fase inflamatória) envolve a liberação de mediadores como serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandinas (GAERTNER *et al.*, 1999). Essa fase também é caracterizada por dor inflamatória desencadeada por uma combinação de estímulos, incluindo a inflamação de tecidos periféricos e a sensibilização central (TJØLSEN *et al.*, 1992).

Conforme já descrito na literatura, fármacos com efeitos centrais, como a morfina e outros opióides, inibem ambas as fases desse teste (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA *et al.*, 1989), enquanto que fármacos que agem periféricamente, como anti-inflamatórios não

esteroidais (AINEs) e corticosteróides, inibem predominantemente a segunda fase (BITENCOURT *et al.*, 2008). Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com a literatura, uma vez que o controle morfina reduziu o tempo de lambedura nas duas fases e a indometacina, um AINE, reduziu apenas na segunda fase.

Estudos realizados com lectinas de algas marinhas mostram que algumas são capazes de inibir as duas fases do teste da formalina, enquanto outras inibem apenas a 2ª fase. Como por exemplo, pode-se citar a lectina da *Hypnea cervicornis*, que na dose de 10,0 mg/kg (via i.v.), reduziu em 80% o tempo de lambedura da pata apenas na segunda fase (BITENCOURT *et al.*, 2008). Figueiredo *et al.* (2010) também confirmaram que a ação antinociceptiva, por via i.v., da lectina da *H. musciformis* é de cunho inflamatório, onde os autores propuseram que o efeito dessa lectina na hipernocicepção inflamatória está associado à inibição da migração neutrofílica e à produção de óxido nítrico. Já para algas que apresentam efeito em ambas as fases, pode-se citar a lectina da *B. seaforthii* que, na dose de 1,0 mg/kg (via i.p.), foi capaz de inibir o tempo de lambedura da pata na 1ª e na 2ª fases em 29,0 e 80,0%, respectivamente (VIEIRA *et al.*, 2004).

Como a LSf inibiu significativamente apenas a segunda fase do teste da formalina, sugere-se que seu efeito antinociceptivo está relacionado à dor inflamatória e, possivelmente, essa lectina apresenta efeito apenas periférico no controle da dor. Além disso, os resultados desse teste confirmaram a importância da estrutura tridimensional da lectina e do seu sítio ligante à manana na sua atividade antinociceptiva, uma vez que a LSf termicamente desnaturada ou associada à manana perdeu a capacidade de reduzir o tempo de lambedura da pata na segunda fase. Assim, para comprovar que a ação analgésica da LSf é de origem periférica, foi, então, realizado o Teste da Placa Quente.

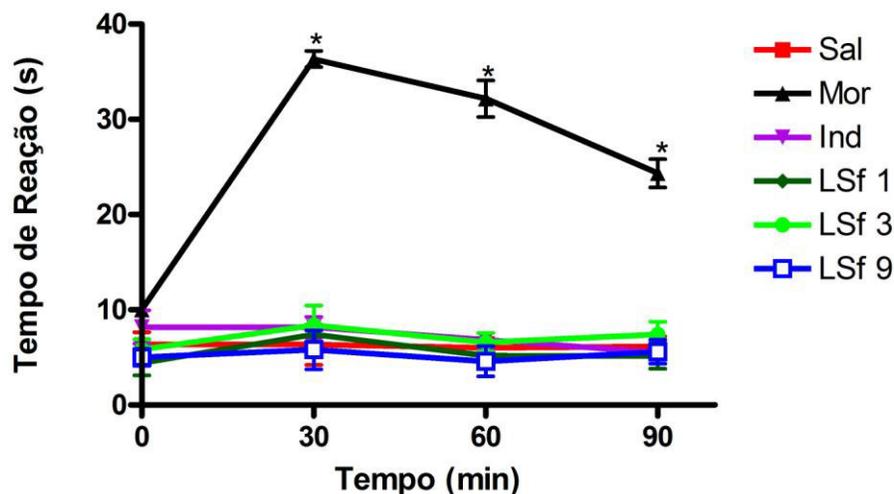
4.2.3 Teste da Placa Quente

Nesse modelo, o comportamento do animal de “sapatear” ou lamber as patas é a indicação da resposta ao estímulo nociceptivo térmico, enquanto que a latência para o aparecimento desta resposta é cronometrada em segundos.

A placa aquecida a 51 ± 1 °C produziu durante a avaliação (30, 60 e 90 min) um tempo de reação nos camundongos de $6,33 \pm 5,20$; $6,00 \pm 2,61$; e $6,17 \pm 2,56$ s, respectivamente. A LSf (1, 3 e 9 mg/kg;i.v.) e o controle positivo indometacina (5 mg/kg;s.c.) não prolongaram o

tempo de reação ao estímulo térmico durante todo o período observado (até 90 min). Porém, a morfina (5 mg/kg;s.c.), um outro controle positivo, prolongou o tempo de reação, significativamente, para $36,33 \pm 2,07$; $32,17 \pm 4,71$; e $24,33 \pm 3,61$, nos tempos de 30, 60 e 90 min, respectivamente (FIGURA 16).

Figura 16 - Efeito da LSf no Teste da Placa Quente em Camundongos.



Os animais (n=6) foram tratados com salina (NaCl 0,9%;i.v.) – Sal; LSf (1, 3 e 9 mg/kg; i.v.); morfina – Mor – e indometacina – Ind (5 mg/kg;s.c.). O tempo de reação (s) foi registrado antes do tratamento (t=0) e 30, 60 e 90 min após o tratamento. Os pontos representam a média \pm E.P.M. do tempo de lambertura da pata. * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao controle negativo Sal. (ANOVA; Teste de Bonferroni).

O teste da placa quente caracteriza-se por apresentar uma resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação dos nociceptores (fibras C e A δ), conduzindo o impulso ao corno dorsal da medula espinhal e, posteriormente, aos centros corticais (TJØLSEN; HOLE, 1997). Portanto, trata-se de um teste antinociceptivo específico de ação central em que agentes opióides exercem seus efeitos analgésicos via receptores supra-espinhal e espinhal (NEMIROVSKY *et al.*, 2001). No entanto, este método é insensível a analgésicos não-esteroidais (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001), sendo útil para distinguir se o efeito antinociceptivo de uma molécula é através de uma ação central ou periférica. Como a LSf nas doses testadas não alterou

o tempo de latência nos intervalos de tempo avaliados, sugere-se que a ação antinociceptiva dessa lectina ocorre via mecanismos periféricos.

Vários estudos têm mostrado diferentes comportamentos das lectinas de algas marinhas, algumas atuando apenas em nível periférico na nocicepção e outras, em nível central e periférico. As lectinas das algas *Hypnea cervicornis*, *P. capillacea* e *C. cupressoides* demonstraram apenas efeito periférico ao serem analisadas nesse modelo (BITENCOURT *et al.*, 2008; SILVA, *et al.*, 2010; VANDERLEI *et al.*, 2010). Porém, as lectinas da *A. multifida*, *B. seaforthii* e *B. triquetrum*, demonstraram ambos os efeitos, central e periférico (NEVES *et al.*, 2007; VIANA *et al.*, 2002).

Assim, através desses três modelos, pode-se concluir que a lectina da alga *S. filiformis* possui atividade antinociceptiva, agindo, prioritariamente, no controle da dor inflamatória, através de mecanismos periféricos. Vale salientar que os fármacos de ação periférica têm a vantagem de contornar vários efeitos colaterais produzidos por analgésicos de ação central, tais como disforia, déficits motores e dependência (MCDUGALL, 2011).

O mecanismo de ação dessa lectina permanece desconhecido, porém sugere-se que o seu efeito seja mediado pelo seu sítio ligante à manana.

4.3 Avaliação do Efeito da LSf na Inflamação Aguda em Ratos

Uma vez que a lectina da alga *S. filiformis* apresentou atividade antinociceptiva periférica, associada com o controle da dor inflamatória e que há uma clara associação entre o processo inflamatório e o desenvolvimento da dor, experimentos foram realizados para observar os efeitos dessa lectina na inflamação, em modelos de peritonite e edema de pata.

4.3.1 Atividade Antiinflamatória da LSf

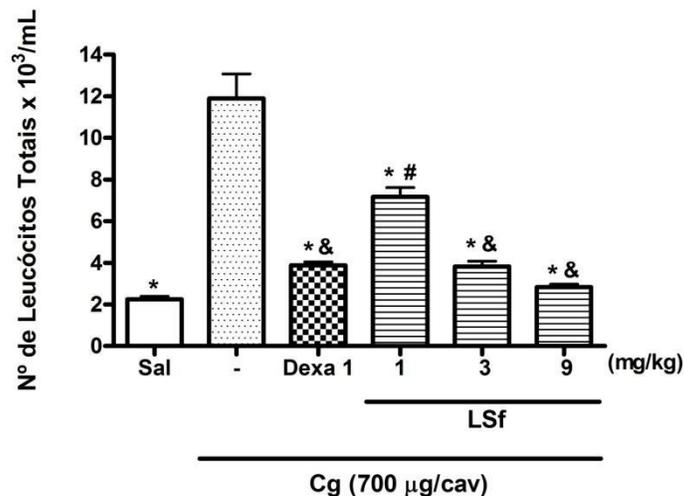
4.3.1.1 Efeito da LSf sobre a Migração Celular Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Ratos

Nesse modelo experimental, a carragenana é utilizada para provocar uma resposta inflamatória aguda, a qual 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). Além disso, ela é capaz de ativar macrófagos residentes, que são importantes para o recrutamento de neutrófilos. A inibição da migração de neutrófilos para o sítio de inflamação é o mecanismo central de ação de alguns fármacos anti-inflamatórios.

Quando administrada por via i.v. em ratos, a LSf, nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg, reduziu significativamente e de forma dose-dependente a migração de leucócitos totais, com uma taxa de inibição da migração de 39,7; 67,9 e 76,2%, respectivamente (FIGURA 17). As doses de 3 e 9 mg/kg diferiram significativamente da dose de 1 mg/kg, mostrando um perfil dose-dependente. O controle positivo dexametasona (Dexa; 1 mg/kg; s.c.) inibiu significativamente essa migração em 67,4%. A LSf nas doses de 3 e 9 mg/kg não diferiram significativamente do controle dexa.

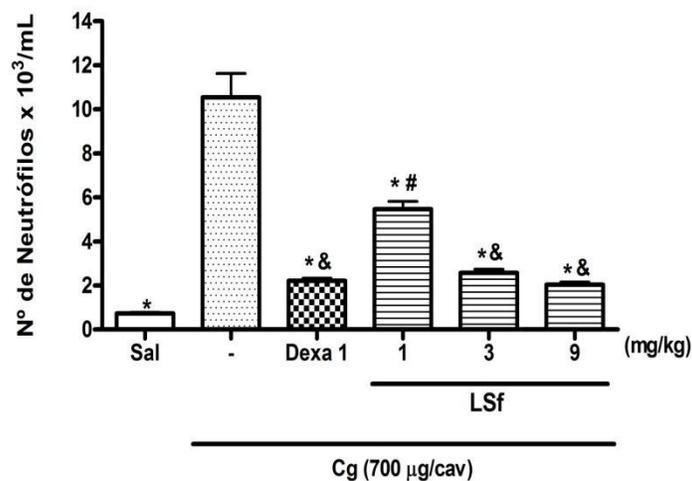
Figura 17 - Efeito da LSf sobre a Migração de Leucócitos Totais Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Ratos.



Os animais (n=6) foram tratados antes da aplicação do estímulo inflamatório carragenana (700 $\mu\text{g}/\text{cav}$; i.p.) com dexametasona (1 mg/kg; s.c.; 1h) e LSf (1, 3 e 9 mg/kg; i.v.; 30 min). Sal: grupo que recebeu apenas Sal (i.p.); e -: grupo que recebeu apenas Cg (i.p.). As barras representam a média \pm E.P.M. do número de leucócitos totais $\times 10^3/\text{mL}$ de fluido peritoneal. * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo -; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Sal; e & $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LSf 1 (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Com relação à contagem diferencial, a LSf (1, 3 e 9 mg/kg) também reduziu significativamente a migração de neutrófilos, sendo a taxa de inibição de 48,1; 75,5 e 80,7%, respectivamente (FIGURA 18). Corroborando com os resultados obtidos na contagem total, as doses de 3 e 9 mg/kg diferiram significativamente da dose de 1 mg/kg. Também não houve diferença significativa entre a inibição da LSf (3 e 9 mg/kg) e do controle positivo dexametasona, que, na dose de 1 mg/kg, inibiu 79,0% da migração de neutrófilos.

Figura 18 - Efeito da LSf sobre a Migração de Neutrófilos Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Ratos.

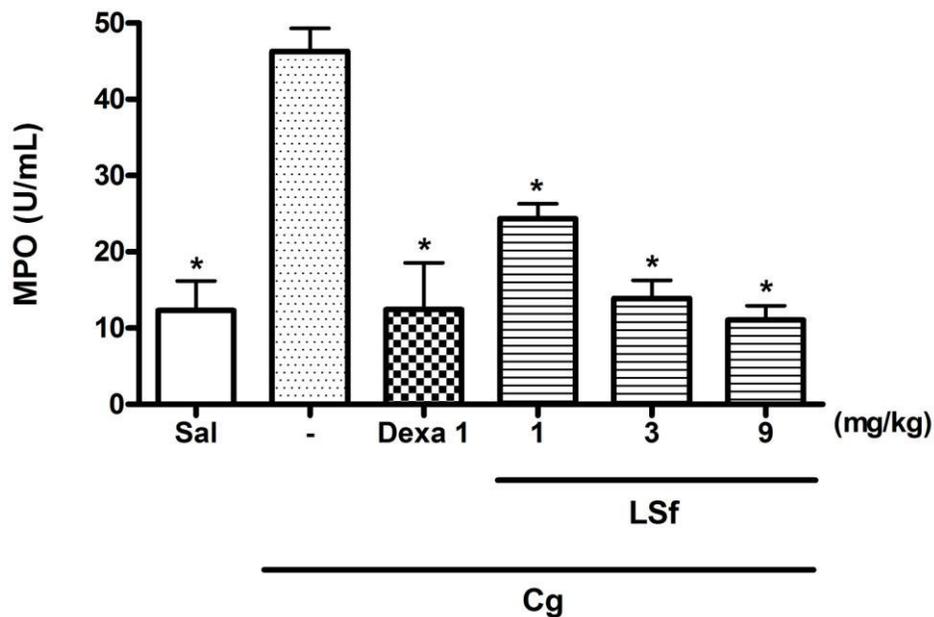


Os animais (n=6) foram tratados antes da aplicação do estímulo inflamatório carragenana (700 µg/cav; i.p.) com dexametasona (1 mg/kg; s.c.; 1h) e LSf (1, 3 e 9 mg/kg; i.v.; 30 min). Sal: grupo que recebeu apenas Sal (i.p.); e -: grupo que recebeu apenas Cg (i.p.). As barras representam a média ± E.P.M. do número de neutrófilos x10³/mL de fluido peritoneal. **p*<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo -; #*p*<0,05 quando comparado ao grupo Sal; e &*p*<0,05 quando comparado ao grupo LSf 1 (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Para confirmar a ação anti-inflamatória da LSf, foi dosada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) nos fluidos peritoneais coletados. Essa enzima está presente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e é utilizada como um marcador quantitativo da infiltração dessas células nos sítios de inflamação. Portanto, o aumento da atividade da MPO é um importante indicativo da progressão do processo inflamatório (DE YOUNG *et al.*, 1989). Os animais tratados com LSf (1, 3, 9 mg/kg) tiveram uma redução significativa de 44,0; 68,0 e

74,6%, respectivamente, na atividade da MPO dos fluidos peritoneais coletados (FIGURA 19). Não houve diferença significativa entre as doses testadas. O controle positivo Dexa reduziu significativamente o nível de MPO em 71,4%, não havendo diferença significativa entre ela e as doses da LSf.

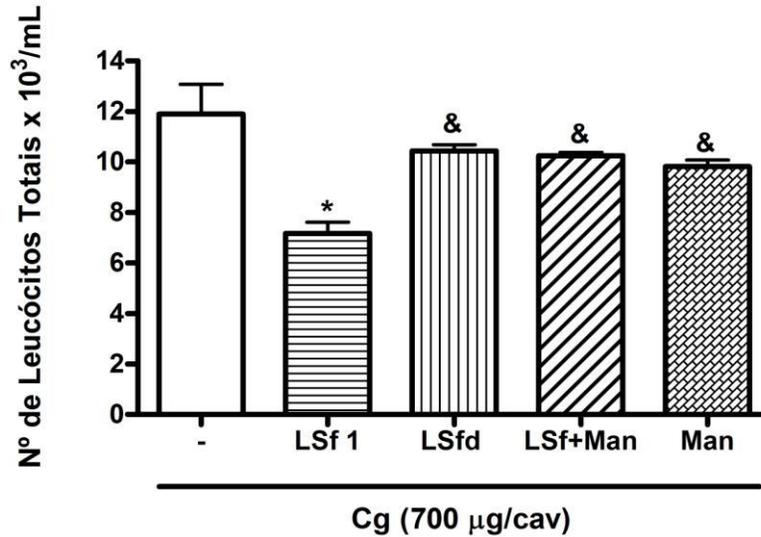
Figura 19 - Atividade da Mieloperoxidase (MPO) nos Líquidos Peritoneais Coletados no Ensaio de Migração Celular.



-: grupo que recebeu apenas Cg (700 µg/cav;i.p.); Sal: grupo que recebeu apenas NaCl 0,9% (i.p.); Dexa: grupo que recebeu pré-tratamento (1 h antes da Cg) com dexametasona (1 mg/kg;s.c.); e LSf 1, 3 e 9: grupo que recebeu pré-tratamento (30 min antes da Cg) com LSf nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg;i.v. As barras representam a média ± E.P.M. da atividade da MPO/mL do fluido peritoneal. * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo - (ANOVA, Teste de Bonferroni).

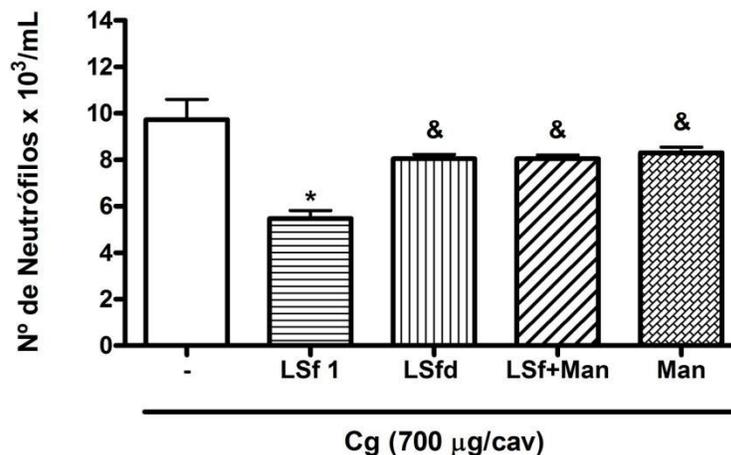
Quando desnaturada (90 °C; 30 min) ou associada ao seu açúcar ligante manana (39 mg/L), a LSf (1 mg/kg) perdeu a sua capacidade de inibir a migração de leucócitos totais e de neutrófilos. A administração de manana isoladamente (39 mg/L) também não inibiu essa migração (FIGURAS 20 e 21).

Figura 20 - Efeito da LSf Desnaturada ou Associada com o Ligante Manana sobre a Migração de Leucócitos Totais Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Ratos.



Os animais (n=6) foram tratados 30 min antes da aplicação do estímulo inflamatório Cg (700 µg/cav; i.p.) com LSf (1 mg/kg; i.v.); LSf (1 mg/kg;i.v.) desnaturada (90 °C;30 min) – LSfd; LSf (1 mg/kg) associada ao seu ligante manana (39 mg/L) i.v. – LSf+Man; e manana (39 mg/L;i.v.) – Man. Cg: grupo que recebeu apenas Cg (i.p.). As barras representam a média ± E.P.M. do número de leucócitos totais x 10³/mL do fluido peritoneal. **p*<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Cg; e &*p*<0,05 quando comparado ao grupo LSf 1 (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Figura 21 - Efeito da LSf Desnaturada ou Associada com o Ligante Manana sobre a Migração de Neutrófilos Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Ratos.



Os animais (n=6) foram tratados 30 min antes da aplicação do estímulo inflamatório Cg (700 µg/cav; i.p.) com LSf (1 mg/kg; i.v.); LSf (1 mg/kg;i.v.) desnaturada (90 °C;30 min) – LSfd; LSf (1 mg/kg) associada ao seu ligante manana (39 mg/L) i.v. – LSf+Man; e manana (39 mg/L;i.v.) – Man. Cg: grupo que recebeu apenas Cg (i.p.). As barras representam a média ± E.P.M. do número de neutrófilos x 10³/mL do fluido peritoneal. **p*<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Cg; e &*p*<0,05 quando comparado ao grupo LSf 1 (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Não se pode afirmar por qual mecanismo de ação a LSf inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos ratos, mas, baseado em pesquisas com outras lectinas, pode-se sugerir que ela interfira na aderência e rolamento dos neutrófilos no processo de deslocamento para o sítio inflamatório e/ou na liberação de mediadores quimioatrativos por células residentes. Estudos realizados com lectinas de algas mostraram que a lectina da *Hypnea cervicornis*, na dose de 10 mg/kg (via i.v.), é capaz de inibir 90% da migração de neutrófilos, sendo o seu mecanismo de ação relacionado com a interação leucócito/endotélio e com a indução da produção de óxido nítrico, importante mediador inflamatório (BITENCOURT *et al.*, 2008). As lectinas das algas *Pterocladia capillacea* (8,1 mg/kg) e *Caulerpa cupressoides* (9 mg/kg) também foram capazes de inibir essa migração em 84,0 e 65,9%, respectivamente (SILVA *et al.*, 2010; VANDERLEI, 2010). Vale ressaltar ainda que a atividade anti-inflamatória da LSf é dependente da sua estrutura tridimensional e do seu sítio de interação com a manana, uma vez que a lectina termicamente desnaturada ou inibida pelo seu ligante perde a sua atividade. Assim, para entender melhor seu mecanismo de ação, estudos mais específicos, avaliando citocinas e células residentes, devem ser realizados.

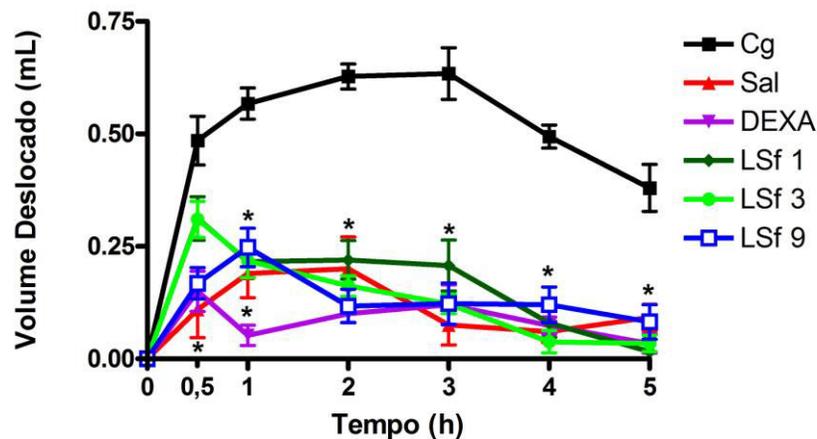
4.3.1.2 Ensaio de Edema de Pata Induzido por Carragenana em Ratos

Como a LSf foi eficiente na inibição da migração de neutrófilos no peritônio de ratos, testou-se a sua ação no modelo de edema de pata induzido por carragenana (Cg). O edema de pata induzido por carragenana é um teste largamente utilizado para o estudo de fármacos anti-inflamatórios, tanto esteroidais como não esteroidais (GARCÍA *et al.*, 2004). Nesse modelo, a Cg provoca a liberação de vários mediadores inflamatórios (aminas biogênicas, prostaglandinas e óxido nítrico, dentre outros) e induz a formação de edema caracterizado por intenso infiltrado neutrofílico (MORRIS *et al.*, 2003). Essa infiltração também pode ser avaliada pela determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) nas secções das patas, em que os níveis teciduais de MPO correlacionam-se com a severidade da doença (POSADAS *et al.*, 2004).

A aplicação da Cg (700 µg/pata) provocou intenso edema, a partir dos primeiros 30 min após o estímulo, que alcançou um pico na 3ª hora, quando comparado ao grupo salina (FIGURA 22). A dexametasona (1 mg/kg;s.c.) inibiu o edema em todos os tempos observados (30 min, 1, 2, 3, 4 e 5 h) em 69,4; 91,2; 84,1; 81,0; 85,7 e 92,1%, respectivamente. A LSf, nas

doses testadas, não inibiu significativamente o edema nos 30 min iniciais, porém apresentou acentuada inibição nos tempos de 1 a 5 h. Na dose de 1 mg/kg, a LSf inibiu em 61,4; 65,1; 66,7; 83,7 e 94,7%, respectivamente. Na dose de 3 mg/kg, inibiu em 61,4; 74,6; 81,0; 91,8 e 92,1%, respectivamente. E, por último, na dose de 9 mg/kg, a LSf inibiu o edema em 65,3; 56,1; 81,0; 81,0; 75,5 e 79%. Não houve diferença significativa entre as doses de LSf. Apenas nos primeiros 30 min, a LSf, nas doses testadas, apresentou diferença significativa com o grupo dexa.

Figura 22 - Efeito da LSf sobre o Edema de Pata Induzido por Carragenana.

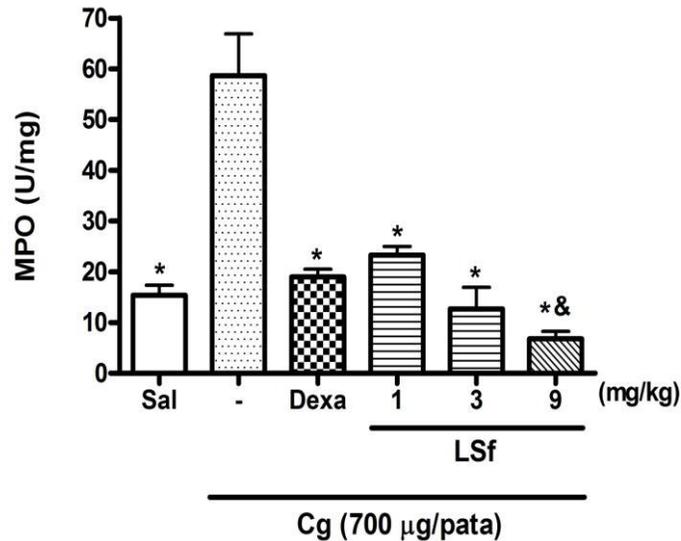


Cg: grupo que recebeu apenas Cg (700 µg/pata;i.pl.); Sal: grupo que recebeu apenas NaCl 0,9% (i.pl.); Dexa: grupo que recebeu pré-tratamento (1 h antes da Cg) com dexametasona (1 mg/kg;s.c.); e LSf 1, 3 e 9: grupo que recebeu pré-tratamento (30 min antes da Cg) com LSf nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg;i.v.. Os pontos representam a média ± E.P.M. da variação do volume das patas (mL). * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo Cg. (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Para confirmar a ação anti-inflamatória da LSf, foi dosada a atividade da MPO nos sobrenadantes dos homogenatos das secções das patas dos ratos que foram tratados com a lectina. Os animais tratados com LSf (1, 3 e 9 mg/kg) tiveram uma redução significativa de 60,3; 73,0 e 88,4 %, respectivamente, da atividade dessa enzima (FIGURA 23). Apesar de na inibição do edema não ter havido diferença significativa entre as doses, a dose de 9 mg/kg diferiu significativamente da dose de 1 mg/kg na redução dos níveis de MPO, mostrando, assim, um comportamento dose-dependente nessa dosagem. O controle positivo Dexa reduziu

significativamente a atividade da MPO em 67,6%, não havendo diferença significativa entre ela e as doses da LSf.

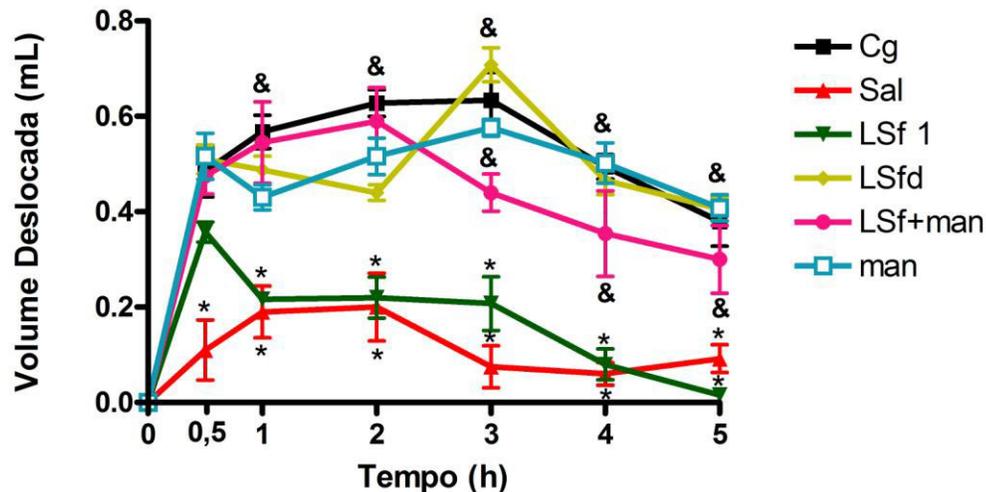
Figura 23 - Atividade da Mieloperoxidase (MPO) no Sobrenadante do Homogenato das Secções das Patas.



Cg: grupo que recebeu apenas Cg (700 µg/pata;i.pl.); Sal: grupo que recebeu apenas NaCl 0,9% (i.pl.); Dexa: grupo que recebeu pré-tratamento (1 h antes da Cg) com dexametasona (1 mg/kg;s.c.); e Lsf 1, 3 ou 9: grupo que receberam pré-tratamento (30 min antes da Cg) com LSf nas doses de 1, 3 ou 9 mg/kg;i.v.. As barras representam a média \pm E.P.M. da atividade da MPO/mg de tecido. * p <0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Cg; e $\&p$ <0,05, quando comparado ao grupo Lsf 1 (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Quando termicamente desnaturada (90 °C; 30 min) ou associada ao seu açúcar ligante manana (39 mg/L), a LSf (1 mg/kg) perdeu a sua capacidade de reduzir o edema induzido por Cg, não diferindo significativamente do grupo Cg. A administração de manana isoladamente (39 mg/L) também não reduziu o edema (FIGURA 24).

Figura 24 - Efeito da Lectina Desnaturada ou Associada ao seu Ligante Manana sobre o Edema de Pata Induzido por Cg.



Cg: grupo que recebeu apenas Cg (700 µg/pata;i.pl.); Sal: grupo que recebeu apenas NaCl 0,9% (i.pl.); LSf 1: grupo que recebeu pré-tratamento (30 min antes da Cg) com LSf na dose de 1 mg/kg;i.v.; LSfd: grupo que recebeu pré-tratamento com LSf (1 mg/kg;i.v.) desnaturada (90 °C;30 min); LSf+Man: grupo que recebeu pré-tratamento LSf (1 mg/kg) associada ao seu ligante manana (39 mg/L) i.v.; Man: grupo que recebeu pré-tratamento apenas com manana (39 mg/L;i.v.). Os pontos representam a média ± E.P.M. da variação do volume das patas (mL). * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo Cg; e & $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LSf 1. (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Segundo Di Rosa *et al.* (1971), o edema provocado por esse agente flogístico ocorre em três fases. Na primeira hora após a injeção de carragenana, o aumento da permeabilidade vascular é mediado por histamina e serotonina. Na segunda hora, esse aumento é mediado pela bradicinina. A fase de maior intensidade do edema ocorre três horas após a injeção de carragenana e caracteriza a ação de prostaglandinas e leucotrienos sobre a permeabilidade capilar. Além disso, também já foi demonstrado que o óxido nítrico tem um papel importante tanto na regulação da permeabilidade vascular como na migração de células induzidas por agentes pró-inflamatórios, incluindo a carragenana (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999).

A LSf reduziu a migração de neutrófilos induzida por carragenana na pata, inibindo a formação do edema, desde a primeira hora até a quinta, agindo, portanto, em todas as fases do processo edematogênico. Isso indica que o efeito anti-edematogênico dessa lectina está relacionado à inibição da migração de neutrófilos, através de diferentes mediadores químicos da

inflamação (histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos). Portanto, são necessários ensaios mais específicos para determinar quais mediadores estão intimamente envolvidos nesse efeito. Além disso, assim como na nocicepção, a estrutura tridimensional e o sítio ligante à manana são essenciais para a ação anti-inflamatória dessa proteína, uma vez que ela perdeu o seu efeito após ser termicamente desnaturada ou associada com manana.

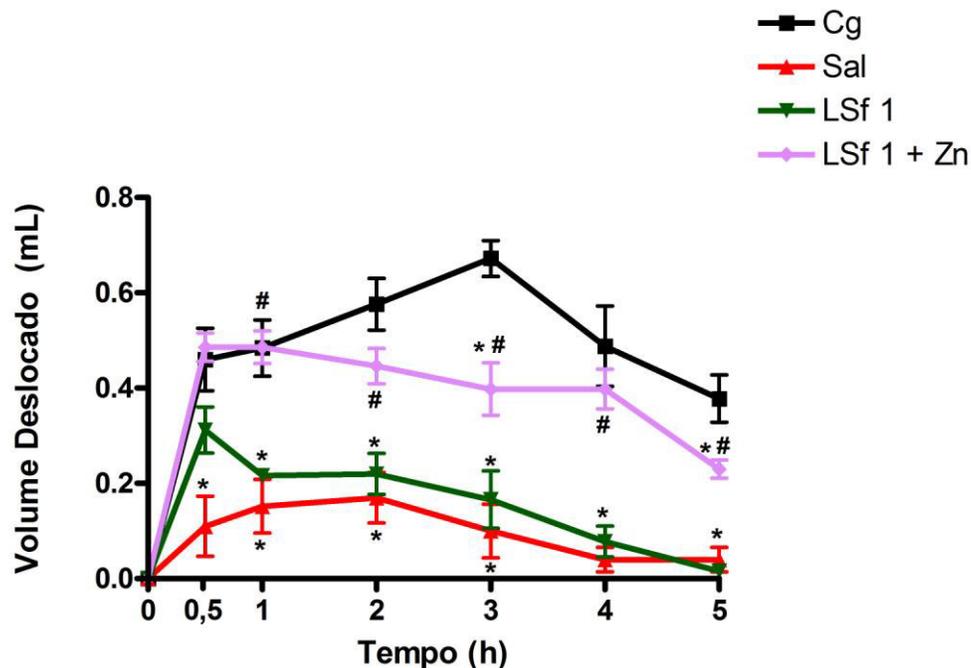
4.3.1.2.1 Análise do Envolvimento da Via da Hemoxigenase (HO-1) na Atividade Anti-inflamatória da LSf

Vários estudos têm demonstrado que a expressão da via da hemoxigenase-1 tem consequências anti-inflamatórias (PAINE *et al.*, 2010). Essa enzima, juntamente com seus produtos, diminui o processo inflamatório em modelo de inflamação induzida por Cg em ratos (WILLIS *et al.*, 1996). Considerando esses dados, esse ensaio foi realizado para avaliar se o efeito anti-inflamatório da LSf envolve a via da hemoxigenase-1. Para isso, utilizou-se zinco protoporfirina (ZnPP) IX, que é um inibidor específico da HO-1. O ZnPP IX tem sido usado como reagente farmacológico que bloqueia seletivamente a ação da HO-1, resultando na inibição dessa via. Ele age como um inibidor competitivo do heme, pois também apresenta um grupo protoporfirina IX na sua estrutura (YANG *et al.*, 2001).

Como mencionado anteriormente, a LSf (1 mg/kg) inibe o edema de pata induzido por Cg desde a primeira até a quinta hora, após a indução. Na presença de ZnPP IX, o efeito da LSf foi alterado (FIGURA 25). Os animais que receberam o tratamento com ZnPP IX e LSf na dose de 1 mg/kg (LSf 1 + ZnPP IX) tiveram redução significativa do edema apenas na terceira e na quinta horas, após a injeção da Cg, quando comparados ao grupo Cg.

Além disso, o grupo LSf 1 + ZnPP IX não apresentou uma redução do edema de pata semelhante ao observado para o grupo submetido apenas ao tratamento com LSf 1, havendo, portanto, diferença significativa entre os dois grupos desde a 1ª até a 5ª h, após a aplicação da Cg. Portanto, a aplicação de ZnPP IX alterou o efeito anti-inflamatório da LSf, diminuindo a capacidade dessa lectina de reduzir o edema.

Figura 25 - Análise do Envolvimento da Via da Hemoxigenase (HO-1) na Atividade Anti-inflamatória da LSf.



Antes de receber a injeção de Cg (700 µg/pata;i.pl.), alguns grupos (n=6) de animais receberam a LSf (1 mg/kg;i.v.) com ou sem ZnPP IX (3 mg/s.c.). Outro grupo recebeu somente sal (NaCl 0,9%;i.pl.) Os pontos representam a média ± E.P.M. da variação do volume das patas (mL). * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo Cg; # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo LSf 1 (ANOVA, Teste de Bonferroni).

A hemoxigenase-1 é uma proteína sensível ao estresse produzido por vários agentes oxidantes. A sua expressão, em resposta a diferentes mediadores inflamatórios, pode contribuir para resolver a inflamação e tem efeitos protetores contra injúrias oxidativas em vários órgãos. Por essa razão, alguns fármacos utilizados no controle dos danos celulares, principalmente oxidativos, agem pela via da HO-1 (GRANGEIRO *et al.*, 2011).

A LSf teve sua capacidade anti-inflamatória alterada quando os animais foram tratados com ZnPP IX. Esses resultados sugerem que a atividade da HO-1 está envolvida no efeito anti-inflamatório dessa lectina, porém não parece ser a única via envolvida.

As lectinas das algas *H. cervicornis*, *P. capillacea*, e *C. cupressoides*, quando administradas por via i.v., também foram capazes de inibir a formação do edema de pata induzido

por carragenana a partir da primeira hora (BITENCOURT *et al.*, 2008; SILVA, *et al.*, 2010; VANDERLEI *et al.*, 2010), porém o mecanismo de ação dessas lectinas ainda permanece desconhecido.

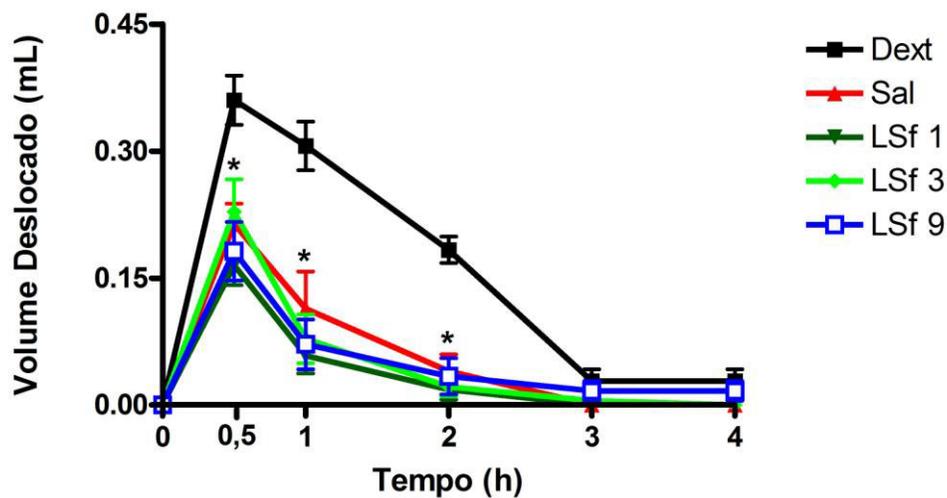
O único relato encontrado na literatura com biomolécula de alga marinha que apresenta efeito anti-inflamatório relacionado com a atividade da HO-1 é do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria birdiae* (VANDERLEI *et al.*, 2011).

4.3.1.3 Ensaio de Edema de Pata Induzido por Dextrano (Dext)

O dextrano é um agente pró-inflamatório que promove a liberação de aminas vasoativas, como a histamina e serotonina, devido à degranulação de mastócitos, causando um edema osmótico, que é caracterizado por um aumento da permeabilidade vascular e baixos níveis de proteínas e neutrófilos no sítio inflamatório (LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982). Portanto, esse modelo foi usado para avaliar se a LSf também é capaz de reduzir um edema osmótico, além do celular induzido por Cg.

A aplicação de Dext (500 µg/pata;i.pl) provocou intenso edema, que alcançou um pico 30 min após o estímulo, quando comparado ao grupo salina (FIGURA 26). Esse edema foi observado até 4 h após a injeção desse agente flogístico. A LSf, nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg, inibiu significativamente esse edema 30 min, 1 e 2 h após a aplicação do dextrano. Na dose de 1 mg/kg, a LSf inibiu o edema em 48,5; 75,0 e 81,8 %, respectivamente. Na dose de 3 mg/kg, o edema foi inibido em 36,4; 66,7 e 81,8%, respectivamente. E, por último, na dose de 9 mg/kg, a LSf inibiu em 45,5; 70,8 e 72,7%, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as doses testadas da LSf.

Figura 26 - Efeito da LSf sobre o Edema de Pata Induzido por Dextrano em Ratos.



Dext: grupo que recebeu apenas dextrano (500 µg/pata;i.pl.); Sal: grupo que recebeu apenas NaCl 0,9% (i.pl.); e LSf 1, 3 e 9: grupos que receberam pré-tratamento (30 min antes da Cg) com LSf nas doses de 1, 3 ou 9 mg/kg;i.v. Os pontos representam a média ± E.P.M. da variação do volume das patas (mL). * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo Dext (ANOVA, Teste de Bonferroni).

O modelo de edema de pata induzido por dextrano permite a avaliação da atividade de novos agentes anti-inflamatórios em processos mediados predominantemente por histamina (LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982). A histamina interage com os receptores H_1 , H_2 , H_3 e H_4 , sendo que os receptores H_1 estão localizados, entre outros locais, nos vasos sanguíneos; os H_2 localizam-se predominantemente na mucosa gástrica; os H_3 são frequentemente expressos no SNC; e os H_4 são encontrados em células hematopoiéticas periféricas como eosinófilos, neutrófilos e células TCD_4^+ (MAINTZ; NOVACK, 2007; RABER, 2007). Fármacos como a loratadina, a cimetidina e a tioperamida agem especificamente nos receptores H_1 , H_2 e H_3 , respectivamente (THURMOND; GELFAND; DUNFORD, 2008).

Nesse trabalho, a LSf reduziu o edema de pata induzido por dextrano, sugerindo que essa lectina possui atividade sobre os eventos vasculares da inflamação, possivelmente pela supressão da liberação de histamina e serotonina pelos mastócitos e/ou pela ação sobre os receptores histaminérgicos (ROOME *et al.*, 2008).

A literatura é escassa em relação às lectinas de algas que tenham algum efeito sobre o edema de pata induzido por dextrano. A lectina da *H. cervicornis*, por via i.v., apesar de apresentar efeito antiedematogênico no edema induzido por carragenana, não apresenta esse mesmo efeito no induzido por dextrano (BITENCOURT *et al.*, 2008). Em relação a pesquisas com lectinas de plantas, foi demonstrado que a lectina da *Araucaria angustifolia*, também por via i.v., inibiu o edema de pata induzido por carragenana e dextrano (MOTA *et al.*, 2006; SANTI-GADELHA, 2006). Nesse trabalho, os autores sugerem que essa lectina tenha a sua ação anti-inflamatória mediada via interação do domínio lectínico com sítios de reconhecimento a carboidrato específicos nos mastócitos, causando a degranulação dessas células.

Com esses resultados, pode-se concluir que a LSf possui efeito anti-inflamatório nos edemas de pata induzidos por Cg e por dextrano. Portanto, sugere-se que essa lectina reduz o edema celular através da inibição da migração de neutrófilos pela ação de diferentes mediadores químicos e da via da hemoxigenase-1, dentre outras vias desconhecidas; e o edema vascular, através da supressão da liberação de histamina e serotonina pelos mastócitos e/ou pela ação sobre os receptores histaminérgicos. Além disso, sugere-se também que o efeito anti-edematogênico dessa lectina envolva o seu sítio ligante à manana, através da sua interação com moléculas responsáveis pela inflamação.

A identificação de substâncias capazes de interagir com alvos moleculares responsáveis pela amplificação do processo inflamatório constitui um campo de pesquisa bastante interessante. Desta forma, este constitui o principal objetivo no estudo de compostos naturais com atividade anti-inflamatória.

A lectina da alga marinha vermelha *S. filiformis* foi eficiente na inibição da inflamação nos modelos de inflamação aguda testados. Assim, estudos mais específicos devem ser realizados para que o seu potencial anti-inflamatório seja melhor conhecido e, posteriormente, ela possa ser utilizada como ferramenta no controle de processos inflamatórios.

4.3.2 Avaliação do Efeito Edematogênico da LSf

Estudos com lectinas de plantas mostram que algumas delas podem produzir tanto efeitos anti-inflamatórios como pró-inflamatórios, dependendo da rota de administração em animais (RANGEL *et al.*, 2011).

Por isso, já que a lectina da *S. filiformis*, quando aplicada por via i.v., apresentou efeito anti-inflamatório no edema de pata em ratos, investigou-se se a mesma lectina, nas mesmas doses testadas, apresenta algum efeito pró-inflamatório, quando aplicada diretamente na pata.

4.3.2.1 Ensaio de Edema de Pata Induzido por LSf

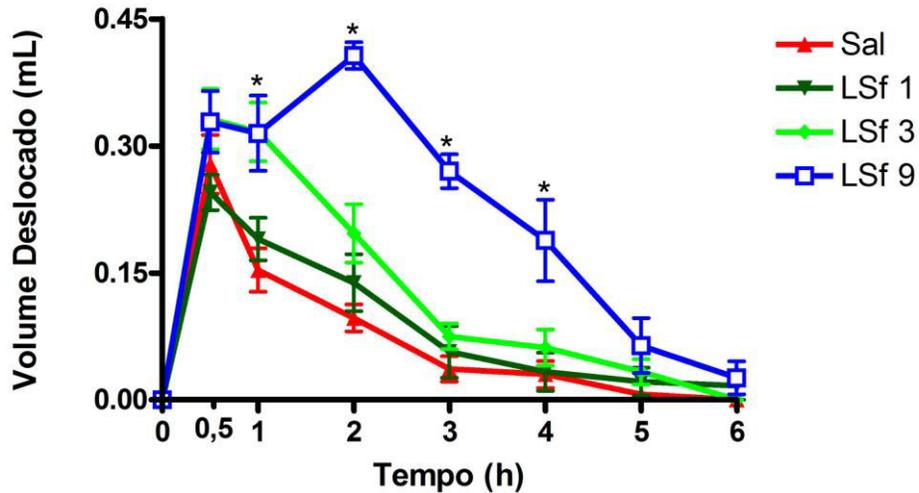
Na dose de 1 mg/kg, a LSf não apresentou diferença significativa quando comparada ao controle Sal (i.pl.). Na dose de 3 mg/kg, a lectina apresentou efeito edematogênico significativo apenas 1 h após a sua aplicação na pata, quando comparada ao grupo Sal. Entretanto, na dose de 9 mg/kg, a LSf apresentou efeito inflamatório 1, 2, 3 e 4 h após a sua aplicação na pata, apresentando um pico na 2ª h, quando comparada ao grupo salina (TABELA 2). A figura 27 ajuda na melhor visualização do perfil do edema.

Tabela 2 - Ensaio de Edema de Pata Induzido por LSf em Ratos.

Grupos Experimentais	Edema de Pata (mL)						
	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Salina	0,28 ± 0,08	0,15 ± 0,06	0,10 ± 0,04	0,04 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00
LSf 1 mg/kg	0,25 ± 0,05	0,19 ± 0,06	0,14 ± 0,08 ^{&}	0,06 ± 0,06 ^{&}	0,03 ± 0,03 ^{&}	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,02
LSf 3 mg/kg	0,33 ± 0,09	0,32 ± 0,09*	0,20 ± 0,08 ^{&}	0,08 ± 0,04 ^{&}	0,06 ± 0,05 ^{&}	0,03 ± 0,03	0,00 ± 0,00
LSf 9 mg/kg	0,33 ± 0,09	0,32 ± 0,11*	0,41 ± 0,04*	0,27 ± 0,05*	0,19 ± 0,12*	0,06 ± 0,06*	0,03 ± 0,03*

Salina (NaCl 0,9%) e LSf (1, 3 ou 9 mg/kg) foram aplicadas na pata direita traseira de ratos (n=6). Utilizando um hidropletismômetro, o volume das patas foi medido, após a injeção do estímulo, nos primeiros 30 min e a cada 1 h, perfazendo um total de 6 h. Os dados representam a média ± E.P.M. da variação do volume das patas (mL). * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo Sal; e [&] $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LSf 9 (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Figura 27 - Ensaio de Edema de Pata Induzido por LSf em Ratos.

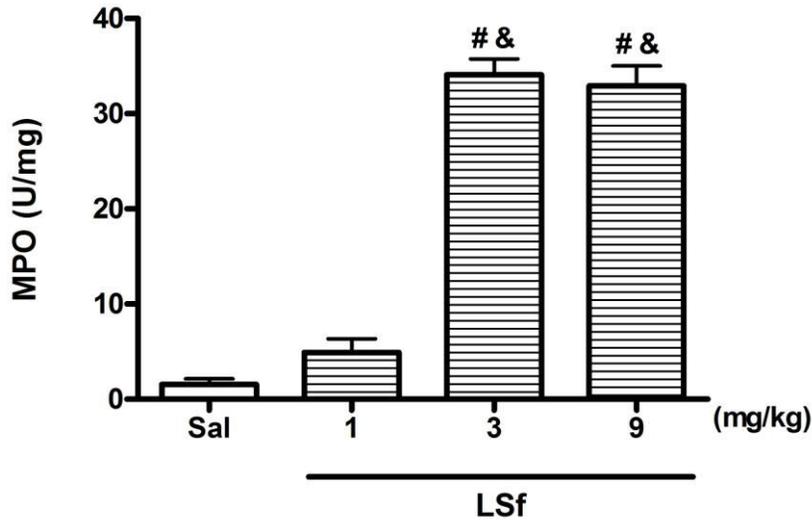


Sal: grupo que recebeu salina (i.pl.); LSf 1, 3 e 9: grupos que receberam LSf nas doses de 1, 3 ou 9 mg/kg;i.pl. Os pontos representam a média \pm E.P.M. da variação do volume das patas (mL). * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo Sal (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Uma vez que a LSf foi capaz de induzir o edema na pata de ratos, investigou-se se este era caracterizado por infiltração neutrofílica. Para isso, foi realizada a dosagem da atividade da MPO nos sobrenadantes dos homogenatos das secções das patas (FIGURA 28).

Corroborando com os resultados apresentados acima, os animais tratados com a LSf na dose de 1 mg/kg não apresentaram aumento significativo da atividade da MPO, quando comparados ao controle salina. Porém, LSf nas doses de 3 e 9 mg/kg induziu um aumento nessa atividade, com relação à salina, e não houve diferença significativa entre essas duas doses. Portanto, apesar de, na dose de 3 mg/kg, não ter havido a persistência do edema, pois este regrediu a partir da 1ª hora, foi significativa a presença de neutrófilos no sítio inflamatório.

Figura 28 - Atividade da Mieloperoxidase (MPO) no Sobrenadante dos Homogenatos das Secções das Patas do Ensaio de Edema de Pata Induzido por LSf.



Sal: grupo que recebeu apenas NaCl 0,9% (i.pl.); e LSf 1, 3 e 9: grupos que receberam LSf nas doses de 1, 3 ou 9 mg/kg (i.pl.). As barras representam a média \pm E.P.M. da atividade da MPO/mg de tecido. # $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo Sal; e & $p < 0,05$, quando comparado ao grupo LSf 1 (ANOVA, Teste de Bonferroni).

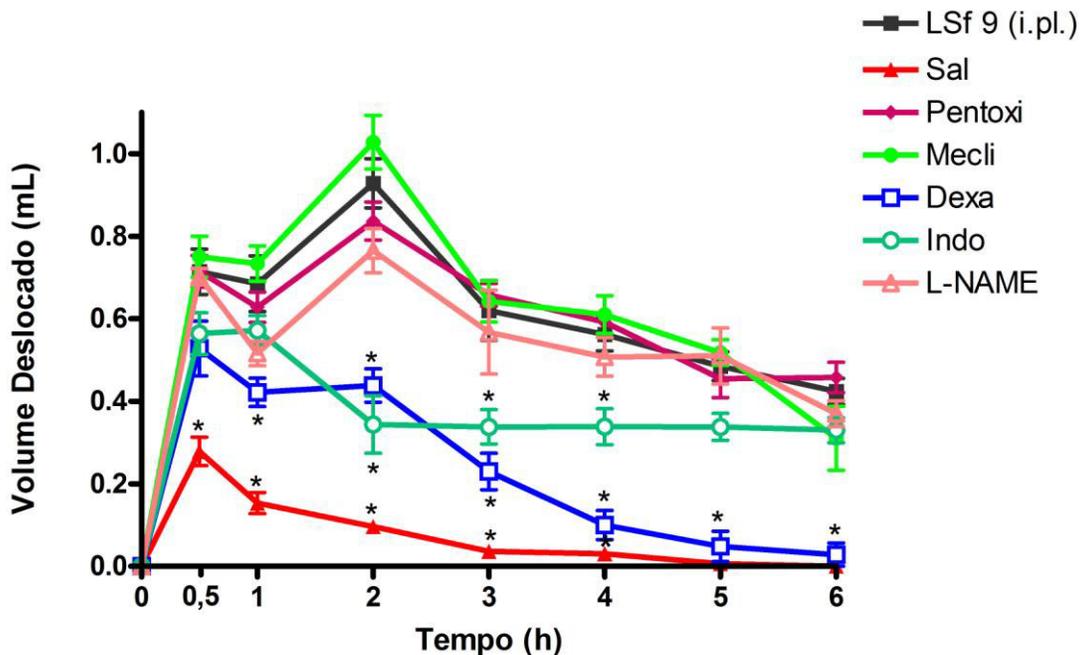
Sabendo que a LSf, quando aplicada na pata, induz a formação de um edema celular com infiltração neutrófilica, objetivou-se elucidar por qual mediador inflamatório essa lectina realiza a sua ação edematogênica. Por isso, foi realizada a modulação farmacológica dessa atividade.

4.3.2.2 Modulação Farmacológica da Atividade Edematogênica da LSf

A modulação foi realizada com os seguintes anti-inflamatórios: indometacina (5 mg/kg; s.c.), dexametasona (1 mg/kg; s.c.), pentoxifilina (90 mg/kg; s.c.), meclizina (40 mg/kg; s.c.) e L-NAME (30 mg/kg; i.v.). Ratos (n=6) foram pré-tratados com esses fármacos e o edema foi induzido pela LSf na dose de 9 mg/kg, dose esta que foi capaz de causar edema mais duradouro.

Pentoxifilina, meclizina e L-NAME não foram capazes de inibir o edema induzido por LSf. Indometacina inibiu o edema na 2^a, 3^a e 4^a h após o estímulo inflamatório em 63,4; 45,2 e 39,3%, respectivamente. Já a dexametasona inibiu esse edema desde a primeira até a sexta hora em 50,7; 52,7; 62,9; 82,1; 89,8 e 92,9%, respectivamente (FIGURA 29).

Figura 29 - Modulação Farmacológica da Atividade Edematogênica da LSf em Ratos.



Antes da aplicação do estímulo inflamatório (LSf 9 mg/kg; i.pl.), os ratos (n=6) foram pré-tratados com pentoxifilina (90 mg/kg; s.c.; 1h), meclizina (40 mg/kg; s.c.; 1h), dexametasona (1 mg/kg; s.c.; 1h), indometacina (5 mg/kg; s.c.; 1h) ou L-NAME (30 mg/kg; i.v.; 30 min). Animais controle receberam apenas o mesmo volume de LSf (i.pl.) ou de salina (NaCl 0,9%; i.pl.). Os pontos representam a média \pm E.P.M. da variação do volume das patas (mL). * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo LSf 9 (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Cada anti-inflamatório utilizado age inibindo mediadores específicos. A pentoxifilina inibe a produção de IL-1 e TNF- α , que participam de vários eventos da resposta inflamatória, incluindo a expressão de moléculas de adesão (CUNHA *et al.* 2000). A meclizina é um inibidor dos receptores H₁ da histamina, sendo, então, um anti-histamínico (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). O L-NAME é um inibidor inespecífico da atividade da óxido nítrico sintase, inibindo a produção

de óxido nítrico (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). A indometacina é um inibidor inespecífico da atividade das enzimas ciclooxigenases, responsáveis pelo metabolismo do ácido araquidônico e síntese de prostaglandina e tromboxano (KANKURI *et al.*, 2001). Já a dexametasona é um inibidor de amplo espectro que inibe vários mediadores, principalmente citocinas, e possui potentes atividades anti-inflamatória e imunossupressora (ASSREUY *et al.*, 2008).

Como a LSf foi inibida por indometacina e dexametasona, sugere-se que o seu efeito edematogênico seja através da ação de mediadores inflamatórios liberados no metabolismo do ácido araquidônico, principalmente pela ativação da via das ciclooxigenases e, conseqüente, síntese de prostaglandinas e tromboxanos, além da liberação de citocinas inflamatórias.

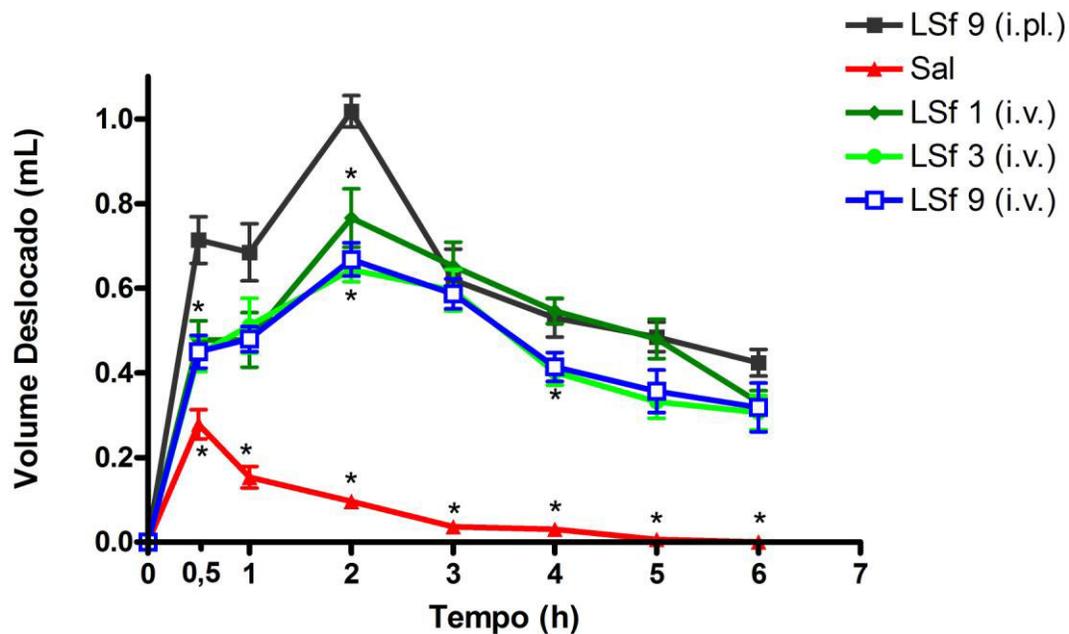
4.3.2.3 Avaliação do Efeito da LSf (i.v.) sobre o Edema de Pata Induzido pela LSf (i.pl.) em Ratos

Como demonstrado nesse trabalho, a LSf, nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg, quando aplicada por via i.v., apresenta efeito anti-inflamatório. Assim, esse ensaio foi realizado com o intuito de avaliar se a LSf aplicada por via i.v. inibe a inflamação induzida pela referida lectina, quando aplicada na dose de 9 mg/kg, por via i.pl.

Na dose de 1 mg/kg, a LSf inibiu o edema em 44,8 e 24,5, nos tempos de 30 min e 2 h, respectivamente. Na dose de 3 mg/kg, a lectina inibiu em 49,4; 37,3 e 28,6 %, nos tempos de 30 min, 2 e 4 h, respectivamente. Por último, na dose de 9 mg/kg, o edema foi reduzido em 48,3; 34,3 e 26,8%, nos tempos de 30 min, 2 e 4 h, respectivamente (FIGURA 30).

Uma vez que foi sugerido que o edema de pata induzido pela LSf se dá através da ação de mediadores inflamatórios liberados no metabolismo do ácido araquidônico, principalmente pela ativação da via das ciclooxigenases, e da liberação de citocinas inflamatórias, como essa lectina, quando injetada por via i.v., apresentou uma leve inibição desse edema, sugere-se que o efeito anti-inflamatório da lectina da *S. filiformis* esteja relacionado à inibição dessa via e da liberação de citocinas e, conseqüente, inibição da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório.

Figura 30 - Avaliação do Efeito da LSf sobre o Edema de Pata Induzido pela LSf em Ratos.



Antes da aplicação do estímulo inflamatório (LSf 9 mg/kg; i.pl.), os ratos (n=6) foram pré-tratados com LSf nas doses de 1, 3 ou 9 mg/kg (i.v.; 30 min antes). Animais controle receberam apenas o mesmo volume de LSf (i.pl.) ou de salina (NaCl 0,9%; i.pl.). Os pontos representam a média \pm E.P.M. da variação do volume das patas (mL). * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo LSf 9 (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Não foram encontrados na literatura estudos que relatem lectinas pró-inflamatórias de algas em modelo de edema de pata. Porém, em modelos de peritonite e de bolsa de ar, as lectinas das algas *B. seaforthii*, *B. triquetrum*, *A. multifida* e *Gracilaria caudata*, também foram capazes de induzir a migração de neutrófilos, entretanto seus mecanismos de ação são desconhecidos (NEVES *et al.*, 2001).

A lectina da gimnosperma *Araucaria angustifolia* (AaL) apresentou um comportamento semelhante ao da lectina da *S. filiformis*, isto é, apresentando tanto efeito anti como pró-inflamatório. Nos modelos de peritonite, induzida por Cg e fMLP, e de edema de pata, induzido por Cg e dextrano, essa lectina, nas doses de 0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg, mostrou efeito anti-inflamatório por via i.v. Entretanto, quando aplicada por via i.pl. nas mesmas doses, a AaL apresentou um efeito edematogênico, que foi inibido por dexametasona, composto 48/80 e pentoxifilina. Além disso, a AaL, quando injetada por via i.v. também inibiu o edema de pata por

ela induzido, quando aplicada por via i.pl. (MOTA *et al.*, 2006). Nesse trabalho, os autores sugerem que os efeitos anti- e pró-inflamatório da AaL ocorreram por vias semelhantes e parecem ser mediados via interação do domínio lectínico com sítios de reconhecimento a carboidrato específicos nos mastócitos, modulando negativamente ou positivamente a sua degranulação.

Estudos realizados com κ -carragenana obtida da mesma alga marinha objeto desse estudo, *Solieria filiformis*, mostraram que, apenas na dose de 1 mg/kg por via s.c., esse polissacarídeo foi capaz de inibir o edema de pata induzido por Cg (tipo λ) e dextrano. Enquanto que nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg por via i.pl., a referida carragenana induziu a formação de edema de maneira dose-dependente, o qual foi inibido por indometacina, dexametasona, L-NAME e pentoxifilina (ARAÚJO *et al.*, 2011). Os autores sugeriram que a formação do edema se deu através da ação das enzimas ciclooxigenases, prostaglandinas, NO e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α). É importante ressaltar ainda que o edema induzido pela dose de 9 mg/kg apresentou um pico na 2^a h, semelhantemente ao edema provocado pela mesma dose da LSf.

Moléculas pró-inflamatórias são importantes para auxiliar no estudo do processo inflamatório e são potencialmente usuais em situações clínicas em que a ativação do sistema imunológico é necessária, ou seja, em pacientes imunodeprimidos.

O desenvolvimento de novos fármacos é um grande desafio para a ciência e é de suma importância a descoberta de compostos que exerçam especificamente sua função sem provocar efeitos adversos ao organismo a ser tratado. Por isso, a lectina da *S. filiformis*, que apresentou promissores potenciais antinociceptivo, anti-inflamatório (por via intravenosa) e pró-inflamatório (por via intraplantar), foi analisada com relação ao seu possível efeito tóxico em camundongos, utilizando modelo de toxicidade por dose repetida durante 7 dias.

4.4 Avaliação da Toxicidade por Dose Repetida em Camundongos

Injeções diárias da LSf (9 mg/kg; i.v.) durante 7 dias não alteraram a massa corpórea dos camundongos, machos e fêmeas (TABELA 3), nem o aspecto físico desses animais, quando comparados aos grupos controles não tratado - NT (constituído por animais que não receberam nenhum tratamento) e salina (constituído por animais que receberam salina – NaCl 0,9%, por via i.v.).

Tabela 3 - Análises Bioquímicas e dos Pesos Corporal e dos Órgãos de Camundongos Submetidos ao Tratamento com LSf (i.v.) por 7 Dias.

Parâmetros	Tratamentos (i.v.)		
	NT	Salina	LSf (9 mg/kg)
Machos			
Peso corporal médio inicial (g)	32,03 ± 1,26	30,29 ± 0,71	26,33 ± 0,72
Peso corporal médio final (g)	35,62 ± 1,91	33,51 ± 1,28	29,06 ± 0,68
Fígado (g/massa corpórea)	6,33 ± 0,20	5,95 ± 0,28	6,38 ± 0,34
Rim (g/massa corpórea)	0,92 ± 0,08	0,97 ± 0,09	1,01 ± 0,04
Coração (g/massa corpórea)	0,62 ± 0,09	0,64 ± 0,06	0,68 ± 0,10
Baço (g/massa corpórea)	0,32 ± 0,06	0,39 ± 0,05	1,50 ± 0,11* [#]
Timo (g/massa corpórea)	0,30 ± 0,08	0,31 ± 0,04	0,31 ± 0,08
Linfonodo (g/massa corpórea)	0,26 ± 0,08	0,28 ± 0,05	0,24 ± 0,05
AST (UI/L)	78,41 ± 2,74	73,16 ± 2,88	75,35 ± 4,49
ALT (UI/L)	82,94 ± 5,58	74,05 ± 5,19	76,82 ± 5,33
Fosfatase Alcalina (UI/L)	103,14 ± 1,92	104,34 ± 0,95	57,99 ± 2,09* [#]
Uréia (mg/dL)	48,17 ± 3,18	47,80 ± 5,85	40,00 ± 4,99
Fêmeas			
Peso corporal médio inicial (g)	27,75 ± 1,48	27,00 ± 0,63	24,00 ± 1,10
Peso corporal médio final (g)	29,83 ± 2,10	29,12 ± 0,65	26,54 ± 1,25
Fígado (g/massa corpórea)	5,60 ± 0,35	5,71 ± 0,41	6,01 ± 0,36
Rim (g/massa corpórea)	0,80 ± 0,06	0,83 ± 0,08	0,85 ± 0,05
Coração (g/massa corpórea)	0,69 ± 0,13	0,76 ± 0,04	0,73 ± 0,06
Baço (g/massa corpórea)	0,37 ± 0,02	0,48 ± 0,08	1,35 ± 0,20* [#]
Timo (g/massa corpórea)	0,32 ± 0,05	0,34 ± 0,07	0,37 ± 0,04
Linfonodo (g/massa corpórea)	0,30 ± 0,06	0,28 ± 0,06	0,28 ± 0,04
AST (UI/L)	84,28 ± 3,90	81,88 ± 6,80	82,21 ± 7,79
ALT (UI/L)	77,49 ± 5,70	90,91 ± 7,51	80,35 ± 5,36
Fosfatase Alcalina (UI/L)	100,38 ± 3,64	103,33 ± 1,30	64,70 ± 5,00* [#]
Uréia (mg/dL)	35,97 ± 4,43	35,95 ± 3,83	33,97 ± 2,08

Os animais (machos e fêmeas; n=6) foram pesados e injetados com LSf (9 mg/kg) diariamente durante 7 dias. Posteriormente, os animais foram anestesiados e amostras de sangue coletadas para dosagens bioquímicas (AST, ALT, fosfatase alcalina e uréia). Os animais foram eutanasiados e alguns órgãos pesados. NT: os animais não receberam nenhum tratamento – não tratado; e Sal: os animais foram tratados com salina (NaCl 0,9%). Os dados foram expressos como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo NT; e [#] $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Sal (ANOVA, Teste de Bonferroni).

No 8º dia, antes do sacrifício, os animais foram anestesiados e tiveram o sangue coletado, para as dosagens bioquímicas das enzimas aspartato aminotransferase (AST/TGO), alanina aminotransferase (ALT/TGP) e fosfatase alcalina, e de uréia.

O aumento das enzimas AST e ALT pode indicar danos no fígado. A AST é essencial para a produção de energia no ciclo de Krebs e é encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias de muitas células, primariamente no fígado, coração, músculos esqueléticos, rins, pâncreas e hemácias. A ALT é encontrada no plasma e em vários tecidos corpóreos, sendo geralmente associada ao fígado. Assim, essas enzimas são liberadas em grandes quantidades no sangue quando há dano à membrana do hepatócito, resultando em aumento da permeabilidade (JODYNIS-LIEBERT *et al.*, 2010). Os animais tratados com a LSf não apresentaram alterações significativas nos níveis de AST e ALT, quando comparados aos grupos controles NT e salina (TABELA 3).

A fosfatase alcalina é uma enzima produzida por diversos órgãos e tecidos, como por exemplo: ossos, fígado e placenta. O aumento do nível dessa enzima pode indicar problemas hepatobiliares (SHANMUGHAM *et al.*, 2007). Os animais tratados com a lectina, tanto machos quanto fêmeas, apresentaram alterações significativas no nível de fosfatase alcalina (TABELA 3). Esses animais apresentaram níveis reduzidos dessa enzima, quando comparados aos grupos controles NT e salina, fato que não é indicador de alterações hepáticas. Níveis diminuídos da fosfatase alcalina são encontrados na desnutrição crônica, na hipofosfatosemia e, ocasionalmente, no hipotireoidismo e anemia perniciosa (QUINDERÉ, 2011). Assim, estudos mais específicos devem ser realizados para a análise desse parâmetro.

Para verificar as alterações renais, foi realizada a dosagem dos níveis de uréia (PEREIRA *et al.*, 2010). Os animais tratados com a LSf não apresentaram alterações significativas no nível de uréia, quando comparados aos grupos controles NT e salina (TABELA 3).

Após o sacrifício, os animais tiveram a cavidade peritoneal aberta, para as análises do fígado, rim direito, coração, baço, timo e linfonodo. Os pesos desses órgãos também não sofreram alterações significativas nos animais tratados com a LSf, quando comparados aos controles, exceto pelo baço, que apresentou-se significativamente aumentado nesses animais (machos e fêmeas) (TABELA 3).

As análises histológicas desses órgãos não indicaram sinais de danos aos tecidos. É importante ressaltar que os fígados retirados dos animais pertencentes aos três grupos apresentaram discreta vacuolização citoplasmática, principalmente na região em torno das veias central e região subcapsular, mas não é uma alteração significativa, sendo comumente vista em hepatócitos normais e é considerada reversível (FIGURA 31).

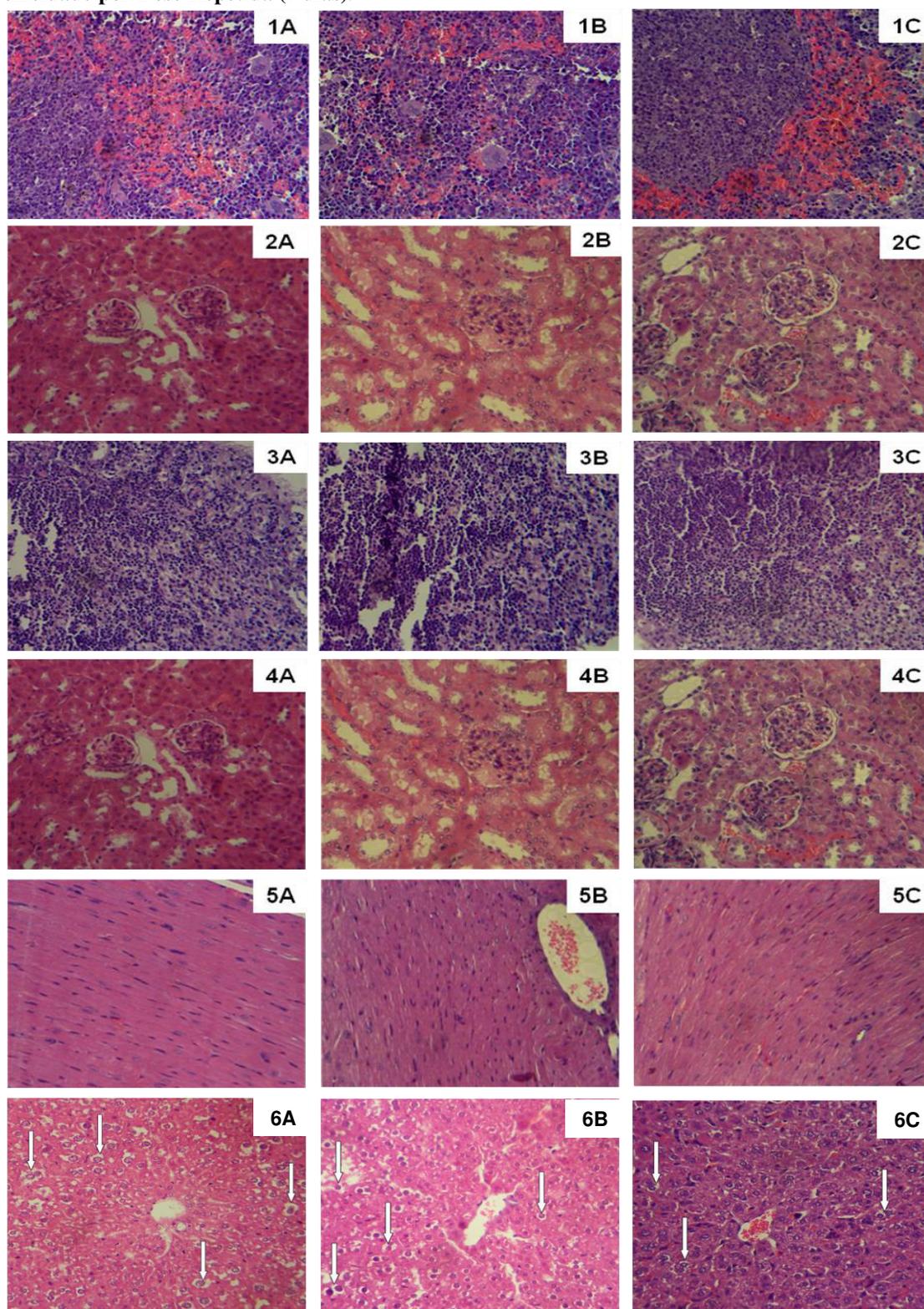
Estudos com polissacarídeos sulfatados obtidos da alga marinha vermelha *Champia feldmannii* mostraram que a esplenomegalia gerada por esses carboidratos pode ser devido a uma ação imunoestimulante dessas moléculas (LINS *et al.*, 2009). Portanto, como os baços dos animais tratados com a LSf apresentaram-se aumentados e sem alterações histológicas, sugere-se que essa esplenomegalia seja devido à uma ação imunoestimulante dessa lectina.

Assim, a análise integrada desses resultados mostra que a lectina da *S. filiformis* mostrou-se atóxica conforme os parâmetros analisados. Estudos mais específicos devem ser realizados para elucidar o motivo da redução dos níveis de fosfatase alcalina nos animais tratados com essa lectina.

As lectinas das algas *H. cervicornis*, *P. capillacea* e *C. cupressoides*, nas doses de 1,0; 8,1 e 9,0 mg/kg, respectivamente, ao serem administradas por via i.v. em camundongos por 7 dias, mostraram resultados semelhantes aos da LSf, sendo, portanto, atóxicas nas doses testadas e nos parâmetros analisados (BITENCOURT *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2010; VANDERLEI, 2010). Porém, o nível de fosfatase alcalina dos animais tratados com essas lectinas não foi analisado.

Tendo em vista o crescente interesse em buscar na natureza moléculas com potencial terapêutico para a resolução/cura de processos patológicos, a lectina isolada da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* credencia-se como uma possível ferramenta na elaboração de fármacos que possam ser usados no controle da dor e do processo inflamatório, podendo também auxiliar no estudo deste.

Figura 31 – Análises Histológicas dos Órgãos Retirados dos Camundongos Utilizados no Ensaio de Toxicidade por Dose Repetida (7 dias).



Fotomicrografias de luz de 4 μm de espessura dos órgãos: (1) baço, (2) timo, (3) linfonodo, (4) rim, (5) coração e (6) fígado. A. Grupo não tratado (NT – ausente de tratamento); B. Grupo salina (NaCl 0,9%; i.v.); C. Grupo LSf (9 mg/kg; i.v.). Notar discreta vacuolização citoplasmática no fígado dos animais pertencentes aos três grupos (setas brancas). Não foi verificada diferença entre machos e fêmeas em nenhum dos grupos analisados. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento de 400X.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A lectina purificada da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (LSf) apresentou seis isoformas, dentre as quais a mais abundante apresentou massa molecular de 26,18 kDa e pI ácido de 5,18. A sua sequência aminoterminal, contendo 37 resíduos de aminoácidos, apresentou 95% de identidade com a da lectina de uma alga pertencente à mesma família, *Eucheuma serra*.

A LSf apresentou efeitos antinociceptivos em camundongos, utilizando modelos experimentais de estímulos químicos e térmico, tendo ação na dor de origem inflamatória, através de mecanismos periféricos.

A LSf apresentou efeitos anti-inflamatórios, quando aplicada por via intravenosa, em ensaios de inflamação aguda em ratos, reduzindo a migração de neutrófilos na peritonite e no edema de pata induzidos por carragenana, e o edema osmótico induzido por dextrano. Seu mecanismo de ação pode estar relacionado à inibição de mediadores inflamatórios e à ativação da via da hemoxigenase-1, necessitando, portanto, de estudos mais específicos.

A LSf apresentou efeito edematogênico em ratos, quando aplicada por via intraplantar, possivelmente, pela ativação da via das ciclooxigenases e de citocinas inflamatórias, cujo edema foi inibido pela referida lectina quando injetada por via intravenosa.

A LSf, quando administrada por 7 dias por via intravenosa em camundongos não apresentou nenhum parâmetro sugestivo de toxicidade, com exceção da redução dos níveis de fosfatase alcalina e da esplenomegalia.

6 CONCLUSÃO

A lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (LSf) purificada por procedimentos cromatográficos sequenciais de troca iônica e de filtração em gel apresentou atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, por via intravenosa, e pró-inflamatória, por via intraplantar. Além disso, sua administração em camundongos (período de 7 dias, por via i.v.) não apresentou parâmetros sugestivos de toxicidade, exceto pelos níveis reduzidos de fosfatase alcalina e esplenomegalia.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, N. G. *et al.* Expression of heme oxygenase gene in rat and human liver. **Biochem Biophys Res Commun**, v.150; p. 717-722, 1988.
- ADCOCK, I. M.; ITO, K.; BARNES P. J. Glucocorticoids: effects on gene transcription. **Proc Am Thorac Soc**, v. 1, p. 247-254, 2004.
- ADCOCK, I. M. *et al.* Redox regulation of histone deacetylases and glucocorticoid-mediated inhibition of the inflammatory response. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, p. 144-152, 2005.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Bot Mar**, v. 34, p. 211–214, 1991.
- AINOUZ, I. L. *et al.* Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algae. **Botanica marina**, v. 35, p. 475-479, 1992.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, p. 40-56, 2004.
- AN, L. *et al.* Heme oxygenase-1 system, inflammation and ventilator-induced lung injury. **European Journal of Pharmacology**, doi: 10.1016/j.ejphar.2011.12.010, 2011.
- ARAÚJO, I. W. F. *et al.* Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1207-1215, 2011.
- ASSREUY, A. M. S. *et al.* Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 691–695, 2008.
- BARANANO, D. E.; SNYDER, S. H. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v. 98, p. 10996-11002, 2001.
- BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.041, 2012.
- BASIVIREDDY, J. *et al.* Indomethacin-induced renal damage: role of oxygen free radicals. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 587-599, 2004.
- BENEVIDES, N. M. B.; LEITE, A. M.; FREITAS, A. L. P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **R Bras Fisiol Veg**, v. 8, n. 2, p. 117-122, 1996.
- BENEVIDES, N. M. B. *et al.* Purification and partial characterization of the lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. **Botanica Marina**, v. 44, p. 17-22, 2001.

BEVILACQUA, M. P. *et al.* Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **An Ver Med**, v. 45, p. 361-378, 1994.

BILATE, A. M. B. Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, p. 86-90, 2007.

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

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of blood group antigens suggested by tests with lectins. In: Plant Lectins. Molecular e Biological aspects. **Ann Ver Plant Physiology**, v. 36, p. 209-234, 1954.

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

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.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618-622, 1982.

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

CANDIANO, G. *et al.* Blue silver: a very sensitive colloidal comassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CARDOZO, K. H. *et al.*, Metabolites from algae with economical impact. **Comp Biochem and Physiol**, v.146, p. 60-78, 2007.

CARVALHO, L. R.; ROQUE, N. F. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química Nova**, v. 23, p. 757-764, 2000.

CAVADA, B. S. *et al.* Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Sciences**, v. 2, p. 123-135, 2001.

COLUCCI M.; SEMERARO N. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: At the nexus of fibrinolysis and inflammation. **Thromb Res**, doi:10.1016/j.thromres.2011.10.031, 2011.

COSTA, F. H. F. *et al.* Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Physiology Molecular Biology Plants**, v. 5, p. 53-61, 1999.

- COUTAUX, A. *et al.* Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, p. 359-371, 2005.
- CUNHA, G. M. A. *et al.* Pentoxifylline improves learning and memory in glutamate-lesioned rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 66, p. 687–694, 2000.
- DE YOUNG, L.M. *et al.* Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 26, p. 335-341, 1989.
- DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A. Screens of anti-inflammatory drugs. **J Pharm Pharmacol**, v. 23, p. 297-298, 1971.
- DOMBROWICZ, D.; CAPRON, M. Eosinophils, allergy and parasites. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 716-720, 2001.
- 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. 4, p. 161-174, 1977.
- EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **J Pharmacol Exper Ther**, v. 107, p. 385-93, 1953.
- EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, p. 1-25, 2010.
- FIGUEIREDO, J.G. *et al.* Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by D. rostrata lectin: Involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**, v. 54, p. 736-744, 2009.
- FIGUEIREDO, J.G. *et al.* Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: Involvement of nitric oxide. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 96, p. 371-377, 2010.
- FREITAS A. *et al.* Heme oxygenase/carbon monoxide biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. **Br J Pharmacol.**, v. 149, p. 345-54, 2006.
- GAERTNER, M. *et al.* Analgesic triterpenes from *Sebastiania Schottiana* roots. **Phytomedicine**, v. 6, p. 41–44, 1999.
- GARCÍA, M.A. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extracts from leaves of *Pimenta racemosa varozua* (Mirtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 69-73, 2004.
- GEISSMANN, F. *et al.* Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. **Science**, v. 327, p. 656-661, 2010.

- GILBERT, A. K. *et al.* Pharmacological characterization of dihydromorphine, 6-acetyldihydromorphine and dihydroheroin analgesia and its differentiation from morphine. **Europe Journal of Pharmacology**, v. 25, p. 123-130, 2004.
- GOADSBY, P. J.; LIPTON, R. B.; FERRARI, M. D. Migraine: current understanding and treatment. **New England Journal of Medical**, v. 336, p. 257-270, 2002.
- GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M.P. Mechanisms of cell protection by heme 316 oxygenase-1. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 50, p. 323-354, 2010.
- GRANGEIRO, T.B. **Clonagem, sequenciamento e expressão do gen da lectina (Con Br) de sementes de *Canavalia brasiliensis***. 1996. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 1996.
- GRANGEIRO N. M. G. *et al.* Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway may be involved in the antinociceptive activity of etoricoxib, a selective COX-2 inhibitor. **Pharmacol Rep**, v. 63, p. 112-9, 2011.
- HAMES, B. D. & RICKWOOD. Gel Electrophoresis of proteins. A practical Approach. **IRL Press**, Washington, pp. 287, 1983.
- HARNEDY, P. A.; FITZGERALD, R. J. Bioactive proteins, peptides and amino acids from macroalgae. **J Phycol**, v. 47, p. 218-232, 2011.
- HEBERT, M.K.; JUST, H.; SCHMIDT, R.F. Histamine excites groups III and afferents from the cat knee joint depending on their resting activity. **Neuroscience Letter**, v. 305, p. 95-98, 2001.
- HOLANDA, M. L. *et al.* Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1769-1773, 2005.
- HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Hemagglutinins in marine algae. **Bull Jap Soc Sci Fisheries**, v. 47, p. 793-798, 1981.
- HORI, K. *et al.* Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from the red alga *Solieria robusta*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2063-2067, 1988.
- HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia**, v. 204/205, p. 561-566, 1990.
- HORI, K. *et al.* Strict specificity for high-mannose type N-glycans and primary structure of a red alga *Euclima serra* lectin. **Glycobiology**, v. 17, p. 479-491, 2007.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

IWALEWA, E. O. *et al.* Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2868-2885, 2007.

KAM, P. C. A.; SEE, A. U. L. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. **Anaesthesia**, v. 55, p. 442-449, 2000.

KANKURI E. *et al.* Effects of a COX-2 preferential agent nimesulide on TNBS-induced acute inflammation in the gut. **Inflammation**, v. 25, p. 301-310, 2001.

KASSUYA, C. A. L. **Atividade antiinflamatória e antinociceptiva de lignanas isolados de *Phyllanthus amarus***. 2006. 121 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2006.

KESHERWANI, V.; SODHI, A. Differential activation of macrophages in vitro by lectin concanavalin A, phytohemagglutinin and wheat germ agglutinin: Production and regulation of nitric oxide. **Nitric Oxide Biol Chem**, v. 16, p. 294-305, 2007.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc**, v.18, p.412-4, 1959.

JAN, R. A.; VISCUSI, E. R. Spinal opioids. A Review. **The International Journal of Pain Medicinal and Palliative Care**, v. 3, p. 90-102, 2003.

JODYNIS-LIEBERT, J. *et al.* Cytotoxicity, acute and subchronic toxicity of ionic liquid, didecyldimethylammonium saccharinate, in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 57, p. 266-273, 2010.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-10, 2001.

KAWAKUBO A. *et al.* The marine red alga *Eucheuma serra* J. Agardh, a high yielding source of two isolectins. **J Appl Phycol**, v. 9, p. 331-338, 1997.

LARSEN, G. L.; HOLT, P. G.. The concept of airway inflammation. **Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, p. 2-6, 2000.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animais Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEITE, Y. F. M. M. *et al.* Purification of a 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.

LEY, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. **Immunological Reviews**, v. 186, p. 8-18, 2002.

- LIAO, W. R. *et al.* Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **J Ind Microbiol Biotchnol**, v. 30, p. 433-439, 2003.
- LIMA, M.E.P. *et al.* 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.
- LINS, K. O. A. L. *et al.* Antitumor properties of a sulfated polyssacharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Dias-Pifferer). **J Appl Toxicol**, v. 29, p. 20-26, 2009.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins in higher olants. **The Biochemistry of Plants**, v. 6, p. 371-447, 1981.
- LIS, H.; SHARON, N. Biological properties of lectins. **The lectins-properties, functions, and applications in biology and medicine**, p. 265-291, 1986.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.
- LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 221, p. 261-267, 1982.
- LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overviiv. **Lancet**, v. 53, p. 1607-1609, 1999.
- LOESER J. D., TREEDE R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v.137, p. 473-477, 2008.
- MAINTZ, L.; NOVAK N. Histamine and histamine intolerance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 1185-1196, 2007.
- MAITY, T. K. *et al.* Studies on anti-inflammatory effect of *Cassia tora* leaf extract (Fam. Leguminosae). **Phytotherapy Research**, v.12, p. 221-223, 1998.
- MATSUMOTO, H. *et al.* Induction of cyclooxygenase-2 causes an enhancement of writhing response in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 352, p. 47-52, 1998.
- MCDOUGALL, J. J. Peripheral analgesia: Hitting pain where it hurts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1812, p. 459-467, 2011.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nat**, v. 454, p. 428-435, 2008.
- MELO, F. R. *et al.* Purification and partial characterization of a lectin from the red marine alga *Vidalia obtusiloba* C. Agardh. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 263-269, 2004.

MENDELL, J. R.; SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. **N Eng J Med**, v. 348, p. 1243-1255, 2003.

MENEZES, R. A. Neuroanatomofisiologia da Dor. IN: MENEZES, R. A. (org.). **Síndromes Dolorosas – Diagnóstico-Terapêutico – Saúde Física e Mental**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, p. 9-19, 1999.

MONCADA S.; PALMER R. M. J.; HIGGS E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, p. 109–142, 1991.

MOORE, N.D. In search of an ideal analgesic for common acute pain. **Acute Pain**, v.11, p.129-137, 2009.

MOORE, T. L.; WEISS, T. D. Mediators of Inflammation. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 14, p. 247-282, 1985.

MORRIS *et al.* Phagocytosis by inflammatory phagocytes: experimental strategies for stimulation and quantification. **Method Mol Biol**, v. 225, p. 35-46, 2003.

MOTA, M. R. L. *et al.* Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 374, p. 1-10, 2006.

NAGANO, C.S. *et al.* Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Proteins and Peptide Letters**, v. 9, p. 159-165, 2002.

NAGANO C. S. *et al.* HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Protein Sci**, v. 14, p. 2167–2176, 2005.

NANTEL, F. *et al.* Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal Pharmacology**, v. 128, p. 853-860, 1999.

NASCIMENTO, A. E. **Efeitos tóxicos de lectina e toxina da alga marinha *Solieria filiformis* sobre camundongos e *Boophilus microplus* (carrapatos)**. 2003. 130 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2003.

NEMIROVSKY A. *et al.* The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. **Anesthesiol Analgesic**, v. 93, p. 197–203, 2001.

NEVES, S. A. *et al.* Neutrophil migration induced *in vivo* e *in vitro* by marine algal lectins. **Inflammation Research**, v. 50, p. 486-490, 2001.

NEVES, S. A. *et al.* Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamourox. **Braz Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 127-134, 2007.

NUNES, E. R. *et al.* Estudo do uso de medicamentos anti-inflamatórios em drogaria da região central de Guarulhos (SP). **Conscientiae Saúde**, v. 5, p. 83-89, 2006.

O'CONNOR, T. M. *et al.* The role of substance P in inflammatory disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 201, p. 167-180, 2004.

PAINE A. *et al.* Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. **Biochem Pharmacol**, v. 80, p. 1895-903, 2010.

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

PEREIRA, W. S. *et al.* Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 602-605, 2010.

PERL, E. R. Pain mechanisms: A commentary on concepts and issues. **Progress in Neurobiology**, v. 94, p. 20-38, 2011.

PERNOW, B. Substance P. **Pharmacology Review**, v. 35, p. 85-141, 1983.

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

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

POSADAS, I. *et al.* Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expressio. **Br J Pharmacol**, v. 142, p. 331-338, 2004.

PUXEDDU, I. *et al.* Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 628-636, 2005.

QUINDERÉ, A. L. G. **Propriedades na nocicepção e na inflamação de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha *Acantophora muscoides***. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2003.

RABER, J. Histamine receptor-mediated signaling during development and brain function in adulthood. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 735-741, 2007.

RAMAGLIA, V.; DAHA, M. R.; BAAS, F. The complement system in the peripheral nerve: Friend or foe? **Molecular Immunology**, v. 45, p. 3865-3877, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Pharmacology**. 5a ed., Elsevier, 2003.

- RANGEL, T. B. A. *et al.* Crystal structure of a pro-inflammatory lectin from the seeds of *Dioclea wilsonii* Standl. **Biochimie**, doi:10.1016/j.biochi.2011.09.001, 2011.
- RIBEIRO, R. A. *et al.* Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111–118, 2000.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **As bases patológicas das doenças**. Cap 3: Inflamação e reparo. 7ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 48-79, 2005.
- ROGERS, D. J.; BLUNDEN, B.; EVANS, P. R. *Ptilota plumosa*, a new source of a blood group B specific lectin. **Medical Laboratory Sciences**, v. 34, p. 193-200, 1977.
- ROGERS, D. J.; HORI, K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobiology**, v. 260/261, p. 589-593, 1993.
- ROOME, T. *et al.* *Aegiceras corniculatum* extract suppresses initial and late phases of inflammation in rat paw and attenuates the production of eicosanoids in rat neutrophils and human platelets. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p. 6-7, 2008.
- SALEH, T. S. F.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**, v. 20, p. 949-56, 1999.
- SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 765-769, 1997.
- SANTI-GADELHA, T. *et al.* Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 1050–1055, 2006.
- SCOTT, D. T.; LAM, F. Y.; FERRELL, W. R. Acute Joint Inflammation - Mechanisms and Mediators. **Gen Pharmac**, v. 25, p. 1285-1296, 1994.
- SCOTT, K. F.; BRYANT, K. J.; BIDGGOD, M. J. Functional coupling and differential regulation of the phospholipase A2-cyclooxygenase pathways in inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 66, p. 535-541, 1999.
- SEDGWICK, D.; WILLOUGHBY, D. A. Initiation of inflammatory response and its prevention. In: BONTA, I. L., BRAY, M. A., PARNHAM, M. J. **Handbook of Inflama**, Elsevier, v. 5, p. 25-47, 1985.
- SHANMUGHAM, L. N. *et al.* ; IL-1b induces alkaline phosphatase in human phagocytes. **Arc Med Res**, v. 38, p. 39-44, 2007.

- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER_KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, p. 385-405, 2004.
- SHIBATA M. *et al.* Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.
- SHIELDS, S. D. *et al.* Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C fiber nociceptors. **Pain**, v. 151, p. 422–429, 2010.
- SHONO, T. *et al.* Involvement of the transcription factor NF-kappaB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. **Mol Cell Biol**, v. 16, p. 4231-4239, 1996.
- SILVA, L. M. C. M. *et al.* Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocladia capillacea*. **Biol Pharm Bull**, v. 33, p. 830-835, 2010.
- 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.
- SPLETTSTOESSER, W. D.; SCHUFF-WERNER, P. Oxidative stress in phagocytethe enemy within. **Microscopy Research and Technique**, v. 57, p. 441-445, 2002
- SPRINGER, T. A. Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration: The Multistep Paradigm. **Cell**, v. 76, p. 301-314, 1994.
- STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z.A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 483-501, 2011.
- STEPHANO, J. L.; GOULD, M.; ROJAS-GALICIA, L. Advantages of picrate fixation for staining polypeptides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 152, p. 308-313, 1986.
- SUGAWARA T. *et al.* The cytotoxic effect of *Eucheuma serra* agglutinin (ESA) on cancer cells and its application to molecular probe for drug delivery system using lipid vesicles. **Cytotechnology**, v. 36, p. 93–99, 2001.
- SZE, P. Introduction to algal characteristics and diversity. **A Biology of the Algae**. New York: Ed. McGraw-Hill Science/Engineering. 3ed, 288p, 1997.
- THURMOND, R. L.; GELFAND, E. W.; DUNFORD, P. J. The role of histamine H₁ and H₄ receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nature Reviews**, v. 7, p. 41-53, 2008.
- TIEMANN, U. *et al.* Platelet-activating factor (PAF)-like activity, localization of PAF receptor (PAF-R) and PAF-acetylhydrolase (PAF-AH) activity in bovine endometrium at different stages

of the estrous cycle and early pregnancy. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 65, p. 125-141, 2001.

TJØLSEN A. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5–17, 1992.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animals models of analgesia. In: Dickenson, A. H.; Besson, J. M. (Ed.). **The Pharmacology of Pain**, p.1-20, 1997.

TOGASHI, R. H. Atividade biológica das lectinas de sementes de *Erythrina fusca* e *velutina*, de algas marinhas *Hypnea musciformis*, *Bryothamnion seaforthii* e *triquetrum* e do produto natural diterpeno casbano, em culturas de *Pseudomonas aeruginosa*. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Sobral, Ce, Brasil.

VAN DAMME, E. J. M. *et al.* Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European journal of biochemistry**, v. 236, p. 419-427, 1996.

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

VANDERLEI, E. S. O. Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh var. *lycopodium* em animais. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2008.

VANDERLEI, E. S. O. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 1113-1118, 2010.

VANDERLEI, E. S. O. *et al.* The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflamm Res**, v. 60, p. 1121-1130, 2011.

VANE, J. R.; WARNER, T. D. Nomenclature of COX-2 inhibitors. **Lancet**, v. 356, p. 1373-1374, 2000.

VIANA, G. S. B. *et al.* Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz and *B. triquetrum* (S. G. Gmel) M. Howe. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 713-722, 2002.

VICENTE, A. M. *et al.* Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 307, p. 1030-1037, 2003.

VIEIRA, L. A. P. *et al.* The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1071-1079, 2004.

- VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Current opinion in structural biology. **Lectins**, v. 9, p. 707-714, 1999.
- WAGNER, D. D. New Links Between Inflammation and Thrombosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, p. 1321-1324, 2005.
- WANG, M.; HONN, K. V.; NIE D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. **Cancer Metastasis Rev**, v. 26, p. 525-534, 2007.
- WANG, L.; DUDEK, S. M. Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. **Microvasc Res**, v. 77, p. 39-45, 2009.
- WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. **J ALLERGY CLIN IMMUNOL**, v. 103, p. 378-381, 1999.
- WHITTLE, B. A. Role of Kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **International Journal of Neuropharmacology**, v. 20, p. 54-60, 1964.
- WILLIS D. *et al.* Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. **Nat Med**, v. 2, p. 87-90, 1996.
- WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin induced oedema in hind paw of rats as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 111, p. 544-7, 1962.
- WITKO-SARSAT, V. *et al.* Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest**, v. 80, p. 617-653, 2000.
- WOUTERS, M. M.; FARRUGIA, G.; SCHEMANN, M. 5-HT receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves. **Neurogastroenterol Motil**, v. 19, p. 5-12, 2007.
- WRIGHT, A. Recent concepts in the neurophysiology of pain. **Manual Therapy**, v. 4, p. 196-202, 1999.
- YANG, G. *et al.* Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis. **Blood**, v. 97, p. 1306-13, 2001.
- YUNES, R. A. *et al.* The use of natural products as sources of new analgesic drugs. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 30, p. 191-212, 2005.
- ZHOU, H. Y. *et al.* Anti-inflammatory activity of 21 (α , β)-methylmelianodiols, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, v. 572, p. 239-248, 2007.
- ZIÓŁKOWSKA, N. E.; WLODAWER, A. Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. **Acta Biochim Pol**, v. 53, p. 617-26, 2006.

ANEXO