



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

**THAIS PONTES CARVALHO FONTENELLE**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA  
LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Bryothamnion triquetrum***

**FORTALEZA-CE**  
**2012**

THAIS PONTES CARVALHO FONTENELLE

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA  
LECTINA DA ALGA MARINHA *Bryothamnion triquetrum*

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.<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia  
Ponte Freitas

Coorientador: Prof Dr André Luiz dos  
Reis Barbosa.

FORTALEZA – CE

2012

THAIS PONTES CARVALHO FONTENELLE

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA  
LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Bryothamnion triquetrum*

Dissertação apresentada a Coordenação do curso de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Bioquímica.

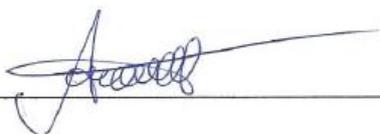
Aprovada em: 19/04/2012

Banca Examinadora



---

Profª Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas ( Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC



---

Prof Dr André Luiz dos Reis Barbosa (Co-orientador)  
Universidade Federal do Piauí – UFPI



---

Prof Dr Bartolomeu Warlene Silva de Souza  
Universidade Federal do Ceará - UFC

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

---

- F763c Fontenelle, Thais Pontes Carvalho.  
Caracterização estrutural e atividade anti-inflamatória da lectina da alga marinha *Bryothamnion triquetrum* / Thais Pontes Carvalho Fontenelle. – 2012.  
39 f. : il., color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.  
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.  
Orientação: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.  
Coorientação: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.
1. Alga marinha. 2. Lectinas. 3. Inflamação. I. Título.

---

CDD 574-192

Dedico essa dissertação primeiramente a Deus que é a minha maior inspiração fonte de toda sabedoria e a minha mãe pela força, oração e amor.

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas pela confiança, orientação e força nesses dois anos de mestrado.

Ao Professor Dr. André Luiz dos Reis Barbosa pela atenção e apoio imprescindível prestado na realização dos ensaios biológicos e também pela participação na banca examinadora.

Ao Professor Dr. Bartolomeu Souza, por gentilmente integrar a banca examinadora deste trabalho.

A Professora Dr.<sup>a</sup> Leila Beltramini pela hospitalidade no seu laboratório.

Ao Dr José Luis pela hospitalidade, atenção e apoio na realização dos ensaios de espectroscopia.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Algas Marinhas, Jacilane Ximenes, Juliana Pereira, Luciano Chaves, Victor Hugo, Sérgio Quesado, Raquel que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

Um agradecimento especial à Jacilane Ximenes pela orientação, conhecimentos transmitidos, dedicação, esforço, amizade e ajuda. Obrigada pela sua colaboração e carinho.

A amiga e colega de mestrado Natássia Ribeiro Albuquerque pelo apoio, amizade e incentivo nas disciplinas e coletas de algas.

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, pelo apoio e companheirismo.

Às minhas amigas irmãs Erika Pires, Monique Bringel, Germana Landim pela verdadeira amizade, pelos momentos de lazer e por me apoiarem e darem força bastante, principalmente na etapa final do mestrado.

Ao meu namorado, Renato Bomtempo pelo incentivo, apoio, amor, força, compreensão e conselhos especialmente, na escrita da dissertação.

Aos meus pais, Benedita Pontes e Salvador Fontenelle pelo amor incondicional e grande torcida para a realização dessa conquista.

Aos meus irmãos David Pontes e Samuel Pontes, pelo amor e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A grande diversidade biológica das algas marinhas e sua ocorrência em praticamente todos os ambientes do planeta demonstram a importância desses seres para os ecossistemas. Um deles é a extração de biomoléculas potencialmente ativa como as lectinas, que são proteínas que 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. O objetivo deste trabalho foi produzir a lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* (Lec), avaliar sua estrutura secundária a partir de técnicas espectroscópicas e investigar as suas propriedades anti-inflamatórias em camundongos. Primeiramente a lectina foi purificada por precipitação com sulfato de amônio (0-60) e cromatografia de troca – iônica, sendo recolhido o primeiro pico (PI). Este pico foi selecionado através da atividade de hemaglutinação obtendo assim a lectina pura a partir de *Bryothamnion triquetrum*, verificada por SDS-PAGE. A lectina foi analisada quanto a sua estrutura secundária por técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular, frente a extremos de pH (4,0 – 11,0) e comparada ao espectro da sua estrutura nativa, e fluorescência frente a diferentes temperaturas que variaram de 25° a 75° em intervalo de 10°. Na avaliação das atividades biológicas, grupos de animais foram submetidos ao pré-tratamento com a Lectina (1,5 e 10mg/kg; i.p.) e indometacina (10mg/kg), 30 min antes do estímulo inflamatório. A atividade anti-inflamatória em camundongos foi avaliada através dos ensaios de peritonite induzida por carragenina - Cg (500 µg/cav) e de edema de pata induzidos por Cg (500 µg/pata); dextrano (500 µg/pata). Extremos do pH (4,0 e 11,0) não alterou a estrutura secundária da proteína. Os dados de fluorescência (280nm e 295nm), mostraram também uma estabilidade, além da presença de aminoácidos aromáticos na sua estrutura. A Lectina inibiu a migração celular na peritonite induzida por Cg e os edemas de pata induzidos por Cg e dextrano. Deste modo, conclui-se que a Lectina obtida do PI da DEAE de *Bryothamnion triquetrum* apresentou estrutura estável em relação a variação de pH e temperatura. Em relação às propriedades biológicas testadas, a Lectina apresentou efeitos anti-inflamatórios nos modelos empregados, podendo ser considerada uma molécula com potencial para estudos mais aprofundados de inflamação.

Palavras-chave: algas marinhas; *Bryothamnion triquetrum*; lectina; espectrometria; inflamação

## ABSTRACT

The great biodiversity of seaweeds and their occurrence in almost all environments on the planet demonstrate the importance of such beings to ecosystems. One example is the extraction of potentially active biomolecules such as lectins, which are proteins that have been subject of research worldwide. This is due to its impressive ability to bind specifically to carbohydrates or substances containing them, providing an immense field of biological application. This work purpose was to produce lectin from the red seaweed *Bryothamnion triquetrum* (Lec), evaluate its secondary structure using spectroscopic techniques, and investigate their anti-inflammatory properties in mice. Initially, the lectin was purified by precipitation with ammonium sulfate (0-60) and ion exchange chromatography, and obtained the first peak (PI). This peak was selected by hemagglutination activity thus obtaining pure lectin from *Bryothamnion triquetrum*, verified by SDS-PAGE. The secondary structure of lectin was analyzed by circular dichroism spectroscopic techniques, against to pH extremes (4.0 to 11.0), and compared to the spectrum of its native structure, and fluorescence against different temperatures, ranging from 25° to 75°, each 10° interval. In biological activities assessment, groups of animals were subjected to pretreatment with the lectin (1.5 and 10mg/kg, ip) and indomethacin (10mg/kg) 30 min before the inflammatory stimulus. The anti-inflammatory activity in mice was evaluated through the assays of peritonitis induced by carrageenan - Cg (500 µg / cav) and paw edema induced by Cg (500 µg / paw), and dextran (500 µg / paw). Extremes of pH (4.0 and 11.0) did not alter the protein secondary structure. Fluorescence data (280nm and 295nm) also showed stability, and aromatic amino acids presence in their structure. Lectin inhibited cell migration in the induced peritonitis by Cg and induced paw edema by Cg and dextran. Thus, it is concluded that the lectin obtained from the *Bryothamnion triquetrum* DEAE PI shows stable structure related to pH and temperature variation. Regarding biological properties tested, the lectin showed anti-inflammatory effects in models used, and it can be considered a molecule with potential for further studies of inflammation.

Keywords: seaweed; *Bryothamnion triquetrum*; lectin; spectrometry, inflammation

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Alga marinha vermelha <i>Bryothamnion triquetrum</i> .....	16
Figura 2 -	Esquema de extração da lectina presente na alga marinha vermelha <i>Bryothamnion triquetrum</i> .....	41
Figura 3 -	Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel.....	48
Figura 4 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) do PI total .....	48
Figura 5 -	Espectro de CD da estrutura nativa .....	50
Figura 6 -	Efeito do pH na estrutura secundária da lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i> .....	51
Figura 7 -	Espectro de emissão de fluorescência da lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i> .....	52
Figura 8 -	Efeito da temperatura na estrutura secundária da lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i> por fluorescência. Excitação de 280 nm.....	53
Figura 9 -	Efeito da temperatura na estrutura secundária da lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i> por fluorescência. Excitação de 295nm .....	53
Figura 10 -	Efeito da Lec sobre o edema de pata induzido por carragenina .....	56
Figura 11 -	Efeito da Lec sobre o edema de pata induzido por dextrano em camundongos.....	58
Figura 12 -	Atividade da mieloperoxidase (MPO) nos líquidos peritoneais coletados no ensaio de migração celular.....	60
Figura 13 -	Efeito da Lec sobre a migração de leucócitos totais induzida por carragenina (Cg) na cavidade peritoneal de camundongos.....	62
Figura 14 -	Efeito da Lec sobre a migração de neutrófilos induzida por carragenina (Cg) na cavidade peritoneal de camundongos .....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação da alga marinha estudada ( <i>Bryothamnion triquetrum</i> ).....	15
Tabela 2 -	Efeito da lectina induzida por carragenina no edema da pata em camundongos.....	56

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
BT	<i>Bryothamnion triquetrum</i>
°C	Grau centígrado
CD	Dicroísmo Circular
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
Cg	Carragenana
DEAE	Dietilaminoetil
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTT	Ditioiteitrol
E.P.M	Erro padrão da média
F0/60	Fração protéica precipitada com sulfato de amônio com 60% de saturação
g	Grama
IgE	Imunoglobulina E
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
Ind	Indometacina
i.p	Intraperitoneal
i.pl	Intraplantar
KDa	Quilodáltons
Lec	Lectina
ug	Micrograma
ul	Microlitro
M	Molar
MPO	Mieloperoxidase
mg	Miligrama
min	Minuto

mL	Mililitro
MM	Massa Molecular
N°	Número
NaCL	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
PAF	Fator de ativação plaquetário
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PGI2	Prostaglandina
pH	Potencial Hidrogeniônico
Raio X	Emissões eletromagnéticas
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema Nervoso central
TEMED	N,N,N' – Tetrametiletlenodiamino
UI	Unidade Internacional
UH	Unidade Hemaglutinante

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Algas marinhas.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Classificação.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Importância econômica das algas marinhas.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2</b>	<b>Lectinas .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Lectinas de algas marinhas e suas atividades biológicas.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Estudos de isolamento e caracterização de lectinas de algas marinhas.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3</b>	<b>Dicroísmo circular (CD) .....</b>	<b>23</b>
<b>1.4</b>	<b>Fluorescência .....</b>	<b>25</b>
<b>1.5</b>	<b>Inflamação .....</b>	<b>25</b>
<b>1.6</b>	<b>Mediadores químicos envolvidos na inflamação.....</b>	<b>28</b>
<b>1.7</b>	<b>Células envolvidas na inflamação .....</b>	<b>29</b>
<b>1.8</b>	<b>Atividades anti-inflamatórias de lectinas de algas marinhas ...</b>	<b>32</b>
<b>2</b>	<b>Justificativa .....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Específico.....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>Materiais .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Alga marinha .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Atividade hemaglutinante.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>Animais.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Reagentes utilizados.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1</b>	<b>Extração e purificação da lectina da alga marinha vermelha <i>Bryothamnion triquetrum</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>5.2</b>	<b>Determinação da atividade hemaglutinante .....</b>	<b>42</b>
<b>5.3</b>	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida .....</b>	<b>42</b>
<b>5.4</b>	<b>Dicroísmo circular (CD) .....</b>	<b>43</b>

5.4.1	Composição estrutural da lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i> em condições nativas .....	43
5.4.2	Estudo estrutural da proteína submetido a extremos de pH.....	43
5.5	Fluorescência .....	43
5.5.1	Análise da composição da proteína sob condições nativas ....	43
5.5.2	Avaliação da estabilidade térmica da lectina de <i>B. triquetrum</i> .	44
5.6	Estudos da atividade antiinflamatória.....	44
5.6.1	Ensaio do edema de pata induzido por carragenana (Cg) e dextrana .....	44
5.6.2	Ensaio da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenana (Cg) .....	45
5.6.3	Avaliação da atividade de mieloperoxidase da pata.....	45
6	Resultados e Discussão.....	47
6.1	Purificação da lectina da alga marinha vermelha <i>Bryothamnion triquetrum</i> .....	47
6.2	Análise da estrutura secundária da proteína por dicroísmo circular (CD) .....	49
6.2.1	Análise da estrutura frente a extremos de pH.....	50
6.3	Análises da composição estrutural da lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i> por fluorescência .....	51
6.4	Estudos da atividade anti-inflamatória .....	54
6.4.1	Efeito da Lectina sobre o edema de pata induzido por carragenana .....	54
6.4.2	Efeito da Lectina sobre o edema de pata induzido por dextrana.....	57
6.4.3	Atividade da mieloperoxidase (MPO) .....	59
6.4.4	Efeito da Lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i> sobre a migração de neutrófilos em cavidade peritoneal induzida por carragenana.....	60
7	Conclusão .....	64
	Referências .....	70

## 1 Introdução

### 1.1 Algas Marinhas

Vivemos em um planeta coberto por grandes extensões de águas, doces ou marinhas, cuja herança obriga-nos a preservar. Nesta imensa "solução" destacamos a diversidade de organismos, de certa forma relacionada à diversidade das comunidades de algas. Pois, cabe a estas a estabilidade dos ecossistemas naturais, quanto maior número de espécies equivalentes funcionalmente, mas com diferentes capacidades de tolerância aos inúmeros fatores ambientais, maior resistência a alterações no meio aquático, inclusive a alterações decorrentes da atividade humana (VIDOTTI E.C; ROLLEMBERG M.C.E, 2004). Logo, a ação extrativista causa degradação ambiental, uma diminuição das espécies de algas nos bancos naturais e um desequilíbrio em todo o ecossistema, ali, presente.

Como espécies representativas do nível trófico inferior, as algas são organismos ecologicamente importantes, porque servem como fonte de alimento fundamental para outras espécies aquáticas e ocupam, assim, uma posição única entre os produtores primários: são um elo importante na cadeia alimentar e essenciais à "economia" dos ambientes aquáticos como alimento, são organismos bem distintos entre si, porém todas as algas têm em comum o fato de produzirem seu próprio alimento através da fotossíntese, pois todas possuem clorofila. (VIDOTTI E.C; ROLLEMBERG M.C.E, 2004). São consideradas o pulmão do mundo, por produzirem uma quantidade de oxigênio muito superior a sua própria respiração.

A exploração comercial de algas marinhas, em grande parte baseada no cultivo de espécies comestíveis ou produção de ágar, carragenana e alginatos, se tornou uma indústria que gera milhões de dólares. Nos últimos anos, empresas farmacêuticas estão utilizando os organismos marinhos, incluindo as algas marinhas, em busca de novas substâncias naturais, para a utilização em pesquisas médicas e bioquímicas (SMIT, 2004).

Diversos fatores ambientais bióticos e abióticos podem influenciar no desenvolvimento de comunidades de algas. As algas podem sofrer efeitos diretos, em curtos tempos e também efeitos indiretos, decorrentes dos efeitos diretos sobre outros organismos no meio. Existem interações entre a comunidade de algas e o

ambiente que apresentam estes efeitos, podendo causar vantagens e desvantagens às algas (VIDOTII e ROLLEMBERG, 2004).

### 1.1.2 Classificação

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

A classe Rhodophyceae, em especial, são os únicos protistas fotossintetizantes com ficoeritrina e ficocianina dentre seus pigmentos. (PURVES *et al.*, 2002).

A **TABELA 1** mostra a classificação geral da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* (**FIGURA 1**), utilizada no presente estudo.

**TABELA 1:** Classificação da alga marinha estudada (*Bryothamnion triquetrum*)

---

Domínio: Eukaryota
Reino: Protista
Filo: Rhodophyta
Classe: <i>Rodhophyceae</i>
Ordem: Ceramiales
Família: Rodhomelaceae
Gênero: <i>Bryothamnion</i>
Espécie: <b><i>Bryothamnion triquetrum</i></b>

---

Fonte: WYNNE (1998).



**FIGURA 1** : Alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum*.  
Fonte: <http://seresvivosdorn.blogspot.com.br/2010/10/alga-vermelha-bryothamnion.html>.

### 1.1.3 Importância econômica das algas marinhas

A grande diversidade biológica das algas marinhas e sua ocorrência em praticamente todos os ambientes do planeta demonstram a importância desses seres vivos para os ecossistemas. As microalgas, juntamente com as cianobactérias, fazem parte do fitoplâncton, que em conjunto com o zooplâncton, formado por crustáceos e larvas de animais de diferentes filos, compõem o plâncton. No ambiente marinho, peixes pequenos e até grandes baleias dependem diretamente do plâncton. As algas marinhas bentônicas ocorrem de alguns centímetros até vários metros de tamanho e desempenham papel semelhante às plantas no ambiente terrestre atuando como produtores (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Dentro do contexto dos produtos de origem marinha, as algas representam um importante recurso para a indústria alimentícia, farmacêutica, entre outras. As algas marinhas são habitualmente consumidas por povos de várias partes do mundo, especialmente em países do Oriente. Como exemplo dos gêneros mais explorados como alimento, podemos citar a *Ulva* (alga verde), *Porphyra*, conhecida popularmente como nori (alga vermelha) e *Kelpi* (alga parda) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Muitas rodofíceas são utilizadas comercialmente como alimento para o homem e para o gado, na extração de ágar utilizado na fabricação de gomas, na formulação de cápsulas de vitaminas e drogas ou ainda como meio de cultura para bactérias.

Outro aspecto de interesse econômico é a extração da carragenina, um hidrocolóide usado na produção de alimentos, principalmente na indústria de laticínios e embutidos, na fabricação de gelatinas e como espessante em sopas e molhos. Também são encontradas diversas aplicações em indústrias de tintas, têxteis, cosméticos, papel e farmacêutica (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

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 são proteínas que possuem uma ampla diversidade estrutural e funcional, e têm sido relatadas em todas as classes de organismos vivos como, invertebrados; vertebrados; algas e microorganismos (Sharon, 2008). Estas proteínas são importantes ferramentas em Glicobiologia devido à multiplicidade de eventos que podem decorrer de sua habilidade em se ligar a carboidratos. Esta habilidade só foi devidamente explorada segundo a sua importância, quando ficou evidente que os oligossacarídeos compreendem um extraordinário sistema de armazenamento de informação biológica, consistindo o chamado glicocódigo (GABIUS, *et al.*, 2002; RUDIGER & GABIUS, 2001). Laine (1994) sugeriu que proteínas apresentam a capacidade de se ligar a carboidratos complexos e decifrar as informações por eles codificadas. Entre as proteínas envolvidas nesta ligação a resíduos glicídicos específicos, estão as lectinas (BREWER *et al.*, 2002). Uma vez que o reconhecimento de carboidratos é operante em todos os organismos, é natural que os ligantes de carboidratos, ou seja, as lectinas sejam também ubíquas na natureza (LEITE *et al.*, 2012).

O estudo das lectinas foi iniciado por STILLMARK (1888), quando verificou que extratos de sementes de algumas plantas aglutinavam hemácias e eram tóxicas para animais. Além disso, ele mostrou que a ricina, isolada de sementes de *Ricinus communis*, aglutinava células epiteliais, hepáticas e leucocitárias. Na mesma ocasião, o autor encontrou propriedades semelhantes em extrato de outra

semente, *Cróton triglium*, que apresentava especificidade diferente da ricina. Em seguida, HELLIN (1891) relatou a presença de outra lectina tóxica, em sementes de *Abrus precatorius*, que foi denominada de abrina.

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

O termo lectina é derivado da palavra, do latim, “*legere*” que significa escolher (BOYD *et al.*, 1954) e foi aplicado devido à propriedade destas proteínas aglutinarem eritrócitos humanos de um grupo específico (MOREIRA *et al.*, 1991). (SHARON & LIS, 1972) apresentaram o termo lectinas, como sendo proteínas aglutinadoras de células com especificidade de reconhecimento por carboidratos. Mais tarde, (GOLDSTEIN, I.J *et al.*, 1980) ampliaram esse conceito, colocando lectinas como sendo proteínas/glicoproteínas de origem não imune com especificidade de ligação a carboidratos, e capazes de aglutinar células e/ ou precipitar glicoconjugados. O conhecimento sobre lectinas tem revelado sucessivas definições para esta proteína especial, dentre as quais, a mais utilizada é aquela citada por (PEUMANS & VAN DAMME, 1995), que as definiram como “proteínas de origem não imune que possuem um ou mais sítios ligantes de carboidratos os quais, no caso de enzimas, não são requeridos para a atividade catalítica”. (CUMMINGS, 1997) definiu uma lectina, como uma proteína que se liga a carboidrato, que não seja anticorpo e não tenha atividade enzimática para carboidratos.

De acordo com suas características estruturais e suas especificidades por carboidrato, as lectinas são classificadas em quatro grandes grupos: Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

- Merolectinas: são biomoléculas que apresentam apenas um único sítio de ligação a carboidratos, ou seja, um único domínio lectínico. Além disso, essas proteínas têm baixo peso molecular e devido a sua natureza monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar células. Como representantes dessa classe tem-se as lectinas de orquídea, específicas para manose e as lectinas de heveína, uma proteína do látex da seringueira (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

- 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). Como exemplo tem a lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum*.
- Quimerolectinas possuem um ou mais sítios de ligação a carboidrato. Assim, contêm além dos domínios lectínicos, um domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica, agindo independente dos primeiros. Dependendo do número dos sítios de ligação a açúcares, as quimerolectinas se comportam como hololectinas, sendo as proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIPs – 2 – abrina e ricina), que além de possuírem atividade de N-glicosidase, possuem também dois sítios de ligação a carboidratos. As quitinases de plantas podem ser referidas como exemplo de quimerolectinas que se comportam como merolectinas. Isto acontece porque as quitinases possuem, além do domínio catalítico, um único domínio de ligação a carboidratos, sendo, portanto, incapazes de aglutinar e/ou precipitar.
- Superlectinas: apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidrato, com especificidades diferentes, ou seja, possuem dois domínios carboidratos ligantes estruturalmente e funcionalmente distintos com capacidade de ligação a açúcares de estruturas diversas. Como exemplos deste grupo têm as lectinas de tulipa.

Como sabemos, as lectinas são encontradas em bactérias, fungos, plantas, animais. Mas são nas plantas que estas proteínas foram mais isoladas e estudadas, sendo distribuídas em muitos tecidos vegetais como, raízes, cascas, folhas, frutos, sementes, bulbos e rizomas, dependendo de cada vegetal. No entanto, é nas sementes que elas são mais abundantes chegando a alguns casos a 10% das proteínas totais (WHITTAKER, 1969; BROEKART *et al.*, 1984; ETZLER, 1985; VAN DAMME *et al.*, 1987a,b; SHARON & LIS, 1989; LIS & SHARON, 1981,1998).

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. 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).

### 1.2.2 Lectinas de Algas Marinhas e suas Atividades Biológicas

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 (FIGUEIREDO *et al.*, 2010), pois o menor tamanho dessas moléculas implicaria em uma menor reação antigênica, além disso não apresentam afinidade por açúcares simples, mas por oligossacarídeos complexos, frequentemente glicoproteínas; e não requerem cátions divalentes para a sua atividade biológica (SOUZA *et al.*, 2010). 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).

Boyd *et al.* (1966), relataram pela primeira vez a presença dessas lectinas em extratos de algas marinhas, utilizando eritrócitos humanos. 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.

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

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

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

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

A lectina da alga marinha a *A. multifida*, também foi avaliada quanto a sua ação antinociceptiva em camundongos (NEVES et al., 2007) ao ser aplicada nos ensaios de contagem do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina mensurado através do tempo de lambadura da pata pelo animal após administração de formalina 1% e teste da placa quente. Neste estudo, os autores constataram que a lectina foi capaz de inibir o número das contorções abdominais; reduzir o tempo de lambadura da pata (teste da placa quente), cujo efeito foi revertido por naloxona indicando o envolvimento do sistema opióide. Estes resultados levaram os autores a sugerir que a lectina da alga *A. multifida* apresenta efeito antinociceptivo de ação central e periférica.

A lectina das algas marinhas *Bryothamnion triquetrum* e *Bryothamnion seaforthii* apresentaram efeito antinociceptivo nas doses de 1 e 5mg/kg por via i.p, utilizando camundongos ( VIANA et al., 2002).

Ensaio clássico de atividade anti-inflamatória foram realizados com as lectinas das algas marinhas *Caulerpa cupressoides*, *Pterocladia capillacea*, *Hypnea cervicornis* e *Solieria filiformis*. Todas as lectinas das algas descritas mostraram-se como potentes inibidores inflamatórios. (BITENCOURT et al.,2008; SILVA et al., 2010; VANDERLEI et al., 2010; ABREU, 2012).

### 1.2.3 Isolamento e Caracterização 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).

Andrade (2004) isolou a lectina da alga marinha verde *Cladophora vagabunda* pela aplicação do extrato em coluna cromatográfica de DEAE-Sephacel.

Vanderlei *et al.* (2010) isolaram a lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* pela combinação dos procedimentos cromatográficos de troca iônica em gel de DEAE-cellulose e afinidade em coluna Sephadex G-100, as proteínas foram eluídas da coluna de afinidade com glucose(0,1M).

Uma lectina da alga marinha vermelha da antártica *Georgiella confluens* foi purificada por SOUZA *et al.* (2010) pelo emprego de cromatografia de troca iônica, em gel de DEAE – Sephacel, seguida do procedimento cromatográfico de afinidade em coluna mucina – Sepharose 4B.

SILVA *et al.*(2010) isolaram a lectina da alga marinha vermelha *Pterocladia capilacea* em cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE – celulose e seguida de cromatografia de afinidade em gel de goma guar.

A cromatografia de afinidade é um tipo de cromatografia de adsorção, no entanto a natureza da sua ligação é mais específica, e a matriz escolhida deverá conter um ligante que será reconhecido pela molécula. Quando aplicamos a esta matriz uma solução proteica, e o ligante apresenta afinidade por uma proteína de interesse, esta ficará retida à matriz, enquanto as demais proteínas serão eluídas por lavagem com o tampão de equilíbrio. Este tipo de cromatografia facilita e proporciona um maior rendimento e praticidade, principalmente no tocante a redução do número de etapas de purificação e ao fato destas apresentarem uma maior segurança na pureza do material obtido (ROGERS *et al.*, 1986). Por ser uma técnica

mais cara que as outras, geralmente ela é utilizada em combinação com outra técnica como, troca-iônica e filtração em gel.

Entretanto, em alguns casos a cromatografia de troca iônica têm-se mostrado de grande auxílio em procedimentos de purificação de lectinas de algas, sendo em alguns casos, suficiente para o isolamento dessas proteínas em algumas espécies. As lectinas de duas espécies de algas marinhas vermelhas, pertencentes ao mesmo gênero, *Bryothamnion triquetrum*(BT) e *B.seaforthii*(BS) foram isoladas ao terem suas frações protéicas submetidas a cromatografias de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. Estas apresentaram atividades inibidas por glicoproteínas; fetuína, avidina e mucina, mostrando-se dependentes de cátions divalentes. Seus pesos moleculares aparentes foram obtidos por filtração em gel de Sephadex G-75, apresentando-se em torno de 3,5 e 4,0 KDa para BT e BS, respectivamente. (AINOUZ *et al.*, 1995).

Após cinco anos de realizado o isolamento por Ainouz e colaboradores em 1995, a aglutinina de *Bryothamnion triquetrum*(Gmelin), teve então, sua seqüência de aminoácidos determinada pela combinação do método clássico de degradação de Edman e por espectrometria de massa (CALVETE *et al.*, 2000). Os autores apresentaram para suas isoformas, valores correspondentes a 8,9805, 8,9644 e 8,9495 KDa conforme calculados por espectrometria de massa. Sua estrutura é composta por 91 aminoácidos, possuindo duas pontes dissulfeto intracadeia de padrão 1-2, 3-4. Não foi observada similaridade de sua seqüência com nenhuma outra lectina de planta ou animal.

### **1.3 Dicroísmo Circular (CD)**

A biologia estrutural de proteínas tem crescido muito, essa realidade é perceptível pelo grande aumento de estruturas de proteínas que são adicionadas no Banco de dados de proteínas por ano. No entanto, a uma percepção crescente da necessidade de realizar estudos estruturais nas condições em que as proteínas realmente funcionam (ou seja, geralmente em solução), bem como em outras condições para fornecer medidas das taxas de mudanças estruturais das proteínas, que muitas vezes são essenciais para a sua função biológica (SHARON *et al.* 2005). A técnica de Dicroísmo circular (CD) está sendo cada vez mais reconhecida como uma técnica valiosa para examinar a estrutura e estabilidade de proteínas em

solução. O espectro de CD é obtido quando o dicroísmo é medido como uma função do comprimento de onda.

O fenômeno de Dicroísmo Circular (CD) refere-se à absorção diferenciada da luz, circularmente polarizada à direita e à esquerda. A forma do espectro de CD fornece informações sobre a estrutura secundária do meio no qual se encontra a proteína, além de permitir estimar as frações destas estruturas, utilizando programas específicos para estes cálculos. Desse modo, pode-se obter a composição estrutural da proteína quanto à quantidade de  $\alpha$ -hélice, folhas- $\beta$ , número de voltas, etc (SHARON *et al.*, 2000, 2005).

Uma vantagem dessa técnica em estudos de proteínas é que a informação estrutural pode ser completamente obtida da análise da região do espectro.

O Dicroísmo circular é uma técnica versátil, pois pode analisar a estrutura da proteína em uma variedade de condições experimentais. Como, variação no pH, variação na temperatura, excesso de ligante entre outros, levando a avaliação da estabilidade estrutural da proteína através de mudanças no espectro de CD quando comparadas a proteínas em seu estado nativo. (SHARON *et al.*, 2005). Mudanças na região de máximo do pico de absorção podem revelar alterações conformacionais da proteína em estudo (GILETTO & PACE, 1996; JOHNSON & FERSHT, 1995; SHARON *et al.*, 2005).

É possível avaliar, também, a interação proteína-ligante, podendo-se então, verificar a integridade de cofatores no sítio ligante de suas respectivas proteínas, por exemplo. A não interação do ligante à proteína resultará no ligante livre em solução que refletirá em uma pequena, mas perceptível, mudança no sinal do espectro obtido em CD, dessa forma, pode-se realizar estudos avaliando tais interações (SHARON *et al.*, 2005).

A análise por CD permite, ainda, avaliar o reenovelamento ou renaturação de uma proteína previamente desnaturada, verificando-se o potencial da mesma em retornar a sua estrutura nativa após ser submetida a determinados processos que levaram a sua desnaturação. O resultado da análise de CD pode ser comparado ao de outras técnicas utilizadas no estudo estrutural de proteínas como Cristalografia de raio-X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que são ótimas técnicas de análise estrutural, no entanto, em contraste ao CD a Cristalografia requer cristais de proteínas devidamente difratados, o que muitas vezes requer

tempo. Já para análise de RMN uma elevada quantidade de proteína se faz necessária para se alcançar o objetivo experimental (SHARON *et al.*, 2005).

Portanto, as análises biofísicas de dicroísmo circular são rápidas e necessitam de pequenas quantidades de proteína em solução, fornecendo resultados bastante satisfatórios sobre sua estrutura.

## 1.4 Fluorescência

A Fluorescência é atualmente uma metodologia amplamente utilizada em biotecnologia, citometria de fluxo, diagnósticos médicos, seqüenciamento de DNA, biologia forense e análise genética, dentre outros. Essa técnica é bastante sensível, evitando-se o uso de marcadores radioativos (JOSEPH *et al.*, 2006).

A fluorescência é um fenômeno formador da luminescência que é a emissão de luz proveniente de uma determinada substância devido a um estado de excitação eletrônica. Este fenômeno ocorre dependendo da natureza do estado de excitação, sendo tipicamente emitido a partir de moléculas aromáticas (JOSEPH *et al.*, 2006). Desse modo essa técnica auxilia enormemente o estudo de proteínas facilitando a análise estrutural da mesma no que diz respeito à composição de aminoácidos aromáticos.

Freitas (2009) caracterizou uma proteína envolvida na defesa de plantas (osmotina) proveniente do látex de *Calotropis procera* quanto a sua composição estrutural, através de técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular e fluorescência, avaliando-a quanto a possíveis alterações estruturais frente a extremos de temperatura e pH, verificando-se portanto, a estabilidade da proteína e sua parcial renaturação após submetida ao tratamento térmico.

## 1.5 Inflamação

O termo inflamação ou flogose (do latim, *inflamaree* do grego *phlogos*, que significa pegar fogo) retrata como os povos mais primitivos comparavam uma região inflamada com algo relativo a chamas, quente ou ardido.

A reação inflamatória consiste num evento complexo que envolve o reconhecimento do agente/estímulo lesivo, para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado (NATHAN, 2002). O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória. No entanto, se a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrem de maneira eficiente e sincronizada, a resposta inflamatória pode levar a uma lesão tecidual persistente induzida pelo acúmulo de leucócitos, colágeno entre outras substâncias que podem ser prejudiciais ao organismo (NATHAN, 2002; BILATE, 2007).

Os processos inflamatórios são necessários para a vigilância imunológica, reparação e regeneração após a lesão (VODOVOTZ *et al.*, 2008). No entanto, a inflamação excessiva ou inadequada é a causa de inúmeras doenças, incluindo artrite, reumatoide, psoríase e doença inflamatória intestinal. Além disso, a inflamação é o maior componente dos danos causados por doenças auto-imunes, e é um colaborador fundamental para doenças como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (LUCAS *et al.*, 2006).

O processo inflamatório é controlado por um grupo de substâncias chamadas mediadores químicos (TEIXEIRA *et al.*, 2003) que podem ser de origem tissular, como as aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária (PAF), eicosanoides, citocinas, radicais livres superóxidos, óxido nítrico e neuropeptídeos ou de origem plasmática, como os sistemas de coagulação do complemento e das cininas (SPINOSA *et al.*, 2006; GILMAN *et al.*, 2006). Muitas dessas moléculas são produzidas localmente e possuem participação comprovada na inflamação dos tecidos, e são, portanto, alvos fundamentais para a intervenção terapêutica em uma variedade de doenças (LUCAS *et al.*, 2006; MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores da inflamação promovem no local da inflamação: vasodilatação dos vasos sanguíneos locais, aumento da permeabilidade dos capilares locais, coagulação dos líquidos nos espaços intersticiais, migração de inúmeros granulócitos e monócitos para o tecido e edema das células. O edema refere-se a um acúmulo anormal de líquido no compartimento extracelular intersticial ou nas cavidades corporais devido ao aumento da permeabilidade vascular e suas conseqüências. Em alguns casos, quando a inflamação atinge ou excede certos níveis, quantidades suficientes desses mediadores endógenos entram na circulação

sistêmica e são disseminados pelo sangue a diferentes órgãos. Isso resulta em uma complexa variedade de reações sistêmicas, coletivamente chamadas de resposta de fase aguda, que é definida como uma resposta multifatorial do organismo a infecções, lesões ou traumas (ROTH *et al.*,2009).

O processo inflamatório ocorre em dois momentos, sendo o primeiro desencadeado logo após a injúria (inflamação aguda), de curta duração e apresenta sinais como, dor, calor, rubor, edema e a perda de função (LEES *et al.*,2004).

O segundo momento depende ou não da resolução do processo na fase aguda (inflamação crônica), caracterizado pela presença de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese e proliferação de tecido conjuntivo. A inflamação crônica, além de perdurar por um período indeterminado, varia de acordo com os tipos de mediadores celulares e humorais envolvidos (SPINOSA *et al.*,2006;Gilman *et al.*,2006) podendo durar semanas ou até anos de duração. Pode ser observada, na fisiopatologia de muitas doenças, como a tuberculose, artrite reumatóide e a doença pulmonar obstrutiva crônica.

As características apresentadas tanto pela inflamação aguda como crônica podem ser divididas em eventos vasculares e celulares. A princípio, desenvolve-se a fase vascular da inflamação, que se caracteriza pela vasodilatação, conferindo o aspecto avermelhado ao tecido e o calor a região como também o aumento da permeabilidade vascular. Tais eventos facilitam a passagem de proteínas plasmáticas para o tecido, carreando, conseqüentemente, uma grande quantidade de água, dando origem ao edema.

Na fase celular, que ocorre simultaneamente à vascular, os leucócitos circulantes aderem-se ao endotélio vascular e transmigram para o tecido intersticial em direção ao local da lesão, através da diapedese, por sinalização de agentes quimiotáticos. A cascata do recrutamento de leucócitos é iniciada pelo rolamento de leucócitos mediado por selectinas no endotélio vascular, os quais se aderem de maneira fraca às células endoteliais, em seguida ocorre rápida ativação de integrinas com subsequente adesão firme aos ligantes endoteliais, transporte transendotelial e a partir de então realizam a diapedese (TARRANT; PATEL, 2006; PHILLIPSON *et al.*,2006;LEY *et al.*,2007).

O tipo celular predominante nesta fase pode ser de células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), quando diante de um processo inflamatório agudo, ou de células mononucleares (monócitos e linfócitos), em um processo

inflamatório crônico. Outras células tais como as células endoteliais, macrófagos, mastócitos e plaquetas podem estar envolvidas (LEES *et al.*,2004).

No caso de uma evolução favorável, o processo inflamatório resulta na eliminação do agente causal, seguida por uma fase de reparação e resolução, que é mediada principalmente por macrófagos residentes nos tecidos e células recrutadas (SERHAN; SARVILL, 2005). No entanto, se a evolução for desfavorável, pode ocorrer supuração, ou seja, os microorganismos superam as defesas orgânicas, lisando as células leucocitárias, formando coleção purulenta ou pode haver a cronificação do processo (SPINOSA *et al.*,2006; GILMAN *et al.*,2006;KATZUNG,2006).

Essas respostas de defesa são iniciadas e reguladas por uma infinidade de diferentes mediadores liberados por diferentes tipos de células e 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 estas células e seus mediadores interagem (RANG *et al.*,2007).

## **1.6 Mediadores químicos 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 ; 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, e são necessários para o processo de inflamação (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 bradicinina provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Sua ação vasodilatadora se dá por produção de prostaglandina (PGI<sub>2</sub>) e liberação de óxido nítrico (SCOTT; LAM; FERRELL, 1994).

O fator de ativação das plaquetas (PAF) é ativado quando há liberação de histamina, trombinas e LTB<sub>4</sub>, sendo sintetizado a partir de fosfolípidos de membrana por ativação de fosfolipases (PLA<sub>2</sub>) (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).

A histamina é um mediador pré-formado presente nos mastócitos e basófilos com um papel central nas reações de hipersensibilidade imediata. Este mediador também modula uma variedade de funções fisiológicas do SNC dos mamíferos, tais como sono / vigília, atenção, ansiedade, dor e percepção homeostase, equilíbrio de fluidos, apetite e da temperatura corporal (OGAWA *et al.*, 2009).

As citocinas são proteínas de massa molecular menor ou igual a 80 kDa, sendo produzidas e secretadas por tipos celulares diversos (linfócitos, macrófagos ativados, células do endotélio, epitélio e tecido conjuntivo) que modulam a função de outras células. As interleucinas são citocinas produzidas por células hematopoéticas e atuam primariamente sobre leucócitos. As quimiocinas são citocinas que estimulam o movimento leucocitário (quimiotaxia) e o movimento dirigido (quimiotaxia) (COTRAN *et al.*, 2000). Elas induzem o rolamento e adesão de neutrófilos pela transmigração pelo espaço extravascular, onde esses dois fenômenos envolvem a participação de diferentes famílias de moléculas de adesão, incluindo selectinas, integrinas e imunoglobulinas (PANES *et al.*, 1999).

### **1.7 Células envolvidas na inflamação**

Células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos são algumas células envolvidas na inflamação, que estão presentes nos tecidos, enquanto plaquetas e leucócitos atingem a área de inflamação a partir do sangue. Os glóbulos brancos ou leucócitos são um grupo diversificado de tipos de células que medeiam a resposta imune do organismo. Eles circulam através do sistema sanguíneo e linfático e são recrutados para os locais de lesão tecidual e infecção. Subtipos de leucócitos são distinguidos por características físicas e funcionais. Eles têm uma origem comum em células-tronco hematopoiéticas e desenvolvem-se ao longo de distintas vias de diferenciação em resposta a estímulos internos e externos. O sistema mononuclear

fagocitário representa um subgrupo de leucócitos, originalmente, descrito, como uma população de células mielóides derivadas da medula óssea, que circulam no sangue, como monócitos ou residem nos tecidos como macrófagos (GEISSMANN *et al.*, 2010).

Os neutrófilos possuem atividade microbicida e fagocitária nos locais de inflamação. São os leucócitos predominantes na circulação, representando cerca de 35% a 75% da população de leucócitos totais (BORREGAARD *et al.*, 2005). Mas possuem vida curta, sendo produzidos na medula óssea e considerados os principais elementos celulares em muitas formas de inflamação aguda principalmente durante o estágio inicial da resposta inflamatória e suas funções são: manutenção da defesa normal do hospedeiro contra microorganismos invasores, remover restos teciduais e agir nos meios extra e intracelular para matar e degradar microorganismos através de enzimas digestivas presentes nos seus grânulos citoplasmáticos. Podem ainda funcionar como descarregador do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos nos vacúolos fagocitários, além de reconhecer, aderir e englobar partículas (fagocitose) (HAMPTON *et al.*, 1998).

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

Os basófilos por sua vez, têm um núcleo volumoso, com forma retorcida e irregular, geralmente com aspecto da letra "S". Estão localizados imediatamente na parte externa de muitos dos capilares do organismo e diferentemente dos demais granulócitos, não são encontrados no tecido conjuntivo e são as menores células granulocíticas, possuindo um núcleo volumoso, bilobado ou multilobado, cromatina nuclear periféricamente condensada em grânulos citoplasmáticos menores do que os outros granulócitos. Constituem menos de 1% dos leucócitos do sangue, sendo difíceis de ser encontrados nos esfregaços de sangue, apresentando a função de secretar mediadores inflamatórios que aumentam a permeabilidade vascular e fatores quimiotáticos que recrutam outras células inflamatórias (RANG *et al.*, 2007).

Os monócitos circulam no sangue, medula óssea e baço e não proliferam em estado normal. Constituem células imunes efectoras, equipados de receptores de quimiocinas e receptores de adesão que medeiam à migração destas células do

sangue para os tecidos durante a infecção. Eles produzem citocinas inflamatórias e levam ao aumento de moléculas tóxicas e células. Eles podem também se diferenciar em células dendríticas ou macrófagos durante a inflamação. A migração para tecidos e a diferenciação em células dendríticas e macrófagos são provavelmente determinada pela inflamação e por receptores de reconhecimento padrão (GEISMANN *et al.*, 2010). Estudos recentes indicam que os monócitos são efetores inatos da resposta inflamatória dos micróbios, matando agentes patogênicos através de fagocitose, da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), mieloperoxidase e citocinas inflamatórias. Em algumas circunstâncias podem desencadear e polarizar a resposta de células T e pode também contribuir na reparação dos tecidos e neovascularização. Além disso, os monócitos podem tanto estimular a suprimir a resposta de células T em doenças infecciosas e auto-imunes (SAHA; GEISMANN, 2011).

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

Os mastócitos, por sua vez, caracterizam-se por serem células globulosas, grandes, com o citoplasma carregado de grânulos que contêm mediadores químicos da inflamação como a heparina, histamina, serotonina e fator quimiotático para neutrófilos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Essas células podem ser encontradas em todos os tecidos vascularizados, mas são especialmente abundantes na mucosa das vias aéreas e do intestino, nos pulmões e na pele e estão estrategicamente posicionados para interagir com antígenos ingeridos ou inalados e secretar seu potente esquadrão de mediadores inflamatórios (WEBER *et al.*, 2003). Além disso, podem iniciar e controlar a resposta imune inata efetiva contra patógenos, por exemplo, efetivando a migração, maturação e / ou função de células dendríticas (DCs) e pela interação com as células T e B (MARSHALL, 2004; GALLI *et al.*, 2005; METZ *et al.*, 2007; METZ; MAURER, 2007; STELEKATI *et al.*, 2007). Durante a

ativação dos mastócitos mediada por IgE, a estrutura cristalina dos grânulos citoplasmáticos de mastócitos humanos da pele e dos pulmões é perdida e isso ocorre devido a uma série de eventos que incluem o alargamento dos grânulos citoplasmáticos, solubilização granular e fusão de membrana de grânulos citoplasmáticos adjacentes com a membrana da superfície da célula (STITES & TERR., 1992). Seu papel como células residentes nos tecidos foi observada no modelo de contorções abdominais, onde após a diminuição da população de mastócitos da cavidade intraperitoneal por lavagem prévia, ocorreu redução da atividade nociceptiva do ácido acético ou do zymosan (RIBEIRO *et al.*, 2000).

As células endoteliais vasculares representam função ativa na inflamação, por serem capazes de secretar óxido nítrico (NO), que promove vasodilatação, aumento da liberação de plasma e de células sanguíneas no local da inflamação (RANG *et al.*, 2007).

### **1.8 Atividades Antiinflamatórias de lectinas de algas marinhas**

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

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

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

No entanto, existe uma quantidade limitada de informação sobre as lectinas de algas marinhas, em comparação a lectinas isoladas de plantas e invertebrados. A

atividade anti-inflamatória das lectinas de plantas superiores tem sido amplamente demonstrada em modelos experimentais, mas poucos estudos usaram lectinas de algas marinhas (VANDERLEI *et al.*,2010).

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

Devido à escassez de dados sobre lectinas de algas marinhas envolvidas no processo de inflamação, vem aumentando nos últimos anos o interesse sobre a atividade anti-inflamatória desses compostos.

Um exemplo é a lectina da alga marinha vermelha *Hypnea cervicornis*, que demonstrou ter propriedades antinociceptiva e ação anti-inflamatória. Bitencourt *et al.*,2008, testou a lectina de *Hypnea* em ratos nos modelos de edema de pata induzido por carragenina, edema de pata induzido por dextrana e no modelo de peritonite( migração de neutrófilos induzido por carragenina). A lectina da alga foi administrada em ratos por i.v.(intravenosa) como um pré- tratamento 30 minutos antes da administração da carragenina ou dextrana. A lectina foi capaz de inibir na 1,2 e 3 hora o edema de pata induzido por carragenina e inibiu também a migração de neutrófilos, porém não foi capaz de inibir o edema de pata induzido por dextrana. Na presença do seu ligante, mucina, a lectina não apresentou seu efeito anti-inflamatório. Estes resultados sugerem que a resposta antiedematogênica da lectina está relacionada com eventos inflamatórios que envolvem a migração de neutrófilos.

Recentemente VANDERLEI *et al.*,(2010) avaliaram a ação anti-inflamatória da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* em modelo de peritonite e edema de pata induzido por carragenina utilizando ratos. A lectina da alga verde foi capaz de inibir o edema de pata e a migração de neutrófilos, se comportando como uma biomolécula com ação anti-inflamatória.

SILVA *et al.*,( 2010) e ABREU,2012 constataram a atividade anti-inflamatória presente na lectina da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea* e na lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. Nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e na migração de neutrófilos induzida por carragenina. A lectina da alga *Solieria filiformis* foi a primeira lectina de alga marinha relatada na literatura que apresentou inibição do edema de pata induzido por dextrana.

Assim os estudos demonstram que a avaliação de lectinas presentes em algas pode vir a favorecer a descoberta de agentes terapêuticos com potencial aplicação no controle da inflamação, constituindo ferramentas importantes para um melhor conhecimento da fisiopatologia e doenças inflamatórias.

Por outro lado, pouco ainda se sabe sobre os efeitos desses compostos na resposta inflamatória, haja vista da ampla aplicabilidade das lectinas de algas marinhas nos diversos campos da sociedade atual.

## 2 Justificativa

A necessidade e a importância de estudos sobre a estrutura de lectinas, bem como, o surgimento de técnicas cada vez mais avançadas vêm favorecendo o desvendamento de estruturas protéicas, de modo que se possam entender melhor seus verdadeiros papéis biológicos.

A estrutura molecular e as características funcionais de um grande número de lectinas, extraídas de plantas terrestres, vem sendo continuamente relatadas (LORIS, 2002). Uma vez que, à aproximadamente 50 anos, após o primeiro relato de hemaglutininas em algas marinhas (BOYD *et al.*, 1966) o número de lectinas isoladas e totalmente caracterizadas continua reduzido, quando comparado ao que tem sido relatado de plantas terrestres. A primeira lectina de alga marinha a ter a sua estrutura primária definida, através de uma combinação dos métodos de degradação de Edman e espectrometria de massa, pertence à espécie da alga vermelha *Bryothamnion triquetrum* (BT) (CALVETE *et al.*, 2000). Sua estrutura, composta de 91 resíduos de aminoácidos, não se mostrou similar a nenhuma lectina de planta ou animal. Em relação ao emprego dessas moléculas na aplicação biológica, ainda pode ser considerado baixo, apesar do seu grande potencial de aplicabilidade (VANDERLEI *et al.*, 2010 ; BITENCOURT *et al.*, 2008). Algumas de suas características físico-químicas ou estruturais fazem delas instrumentos especialmente interessantes com vistas às aplicações biológicas: são em geral moléculas pequenas, portanto, não são capazes de induzir resposta imunológica, possuem grande estabilidade devido à presença de pontes dissulfeto em suas estruturas e, ainda, apresentam especificidade por polissacarídeos complexos ou glicoconjugados, semelhantes aos encontrados na parede celular (ROGERS & HORI, 1993; HORI *et al.* 2000; CALVETE *et al.*, 2000). As aglutininas de algas marinhas podem ser usadas com eficiência para diagnosticar poliformismo de glicoproteínas, tipagem de grupos sanguíneos, estimulação e/ou inibição da atividade mitogênica, reconhecimento de células leucêmicas e tumorais, dentre outras (HARNEDY; FITZGERALD, 2011). Diante da importância da elucidação das estruturas físicas das lectinas e do seu forte potencial nas aplicações biológicas, esse trabalho busca estudar a lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* utilizando técnicas espectroscópicas e em ensaios anti-inflamatórios.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Geral

O presente trabalho teve por objetivo estudar parcialmente a estrutura secundária e avaliar a atividade antiinflamatória da lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum*.

#### 3.2 Específico

- ✓ Produzir a lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum*, através de técnicas cromatográficas e eletroforese unidimensional;
- ✓ Avaliar a composição estrutural da lectina de Bt por Dicroísmo circular;
- ✓ Avaliar as mudanças conformacionais em diferentes pH da lectina de Bt por Dicroísmo circular;
- ✓ Analisar em condições nativa a composição da lectina por Fluorescência;
- ✓ Analisar a estabilidade térmica da lectina por Fluorescência;
- ✓ Avaliar os efeitos antiinflamatórios da lectina de Bt utilizando os modelos de edema de pata e peritonite além de analisar a atividade da mieloperoxidase.

## **4 Materiais**

### **4.1 Alga marinha**

A alga marinha *Bryothamnion triquetrum* KUTZ (1843) foi coletada durante marés de sizígia, na praia de Flecheiras, município de Trairí, litoral cearense. As amostras coletadas foram transportadas ao laboratório em sacos plásticos. Posteriormente, as algas foram lavadas em água corrente e retirado as epífitas. Após a lavagem elas foram armazenadas a -20°C para posterior utilização. Esta alga esta catalogada no herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, com o seguinte número de identificação EAC: 31138. (FIGURA 1).

### **4.2 Atividade hemaglutinante**

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 para a utilização nos ensaios de atividade hemaglutinante.

### **4.3 Animais**

Foram utilizados camundongos albinos variedade *Swiss* (20-25g) adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos em salas com temperatura ambiente adequada e livre acesso à ração e água no Biotério do Departamento de Bioquímica. Os ensaios com os animais seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança, recebendo aprovação da comissão de ética de pesquisa com animais de laboratório do comitê de ética da Universidade Federal do Ceará (CEPA N° 12/12).

### **4.4 Reagentes utilizados**

Acrilamida – (Sigma, U.S.A)

Albumina Sérica Bovina - (Sigma, U.S.A)

Comassie Brilliant Blue G-250 - (Sigma, U.S.A)

DEAE – Sephacel – ( Merck, Darmstadt,Alemanha)  
 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) – (Biorad)  
 $\beta$ -Mercaptoetanol - (Sigma, U.S.A)  
 N,N- metilenobisacrilamida - (Sigma, U.S.A)  
 Nitrato de prata – ( Labsynth,Brasil)  
 Papaína - (Sigma, U.S.A)  
 Persulfato – ( Bioreagent)  
 TEMED - (Sigma, U.S.A)  
 Sulfato de Amônio  
 Cloreto de Sódio (NaCl)  
 Carragenina – (Sigma, U.S.A)  
 Indometacina – (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A)  
 Composto 48/80 (Sigma)  
 Dextrana (Dextran 70 , Pharmacia , UPPSALA)  
 Eosina (MERCK)  
 Hematoxilina (REAGEN)  
 Cloreto de Sódio (Vetec)  
 Álcool 70% (Alcoollux)  
 Câmara de fluxo laminar (Veco)

**Solução de turk** (diluidor de glóbulos brancos):

- Acido acético Glacial P. A (Merck)..... 20 ml
- Violeta Genciana..... 2,0 ml
- Água destilada..... 1000 ml

**Solução para pletismógrafo:**

- Cloreto de Sódio (Vetec)..... 45,0 mg
- Solução Padrão..... 0,3 ml
- Água destilada..... 100 ml

O pH foi ajustado para 1,8 – 2,0 com HCl ( 5 ml /L ) . As diluições foram feitas  
 Em solução salina 0,9 %

**Solução de hematoxilina e eosina :**

- Solução de hematoxilina de Carazzi
- Solução saturada de carbonato de lítio
- Soluções de eosina acidificadas com ácido acético
- Creosoto xileno

**Solução para o ensaio de mieloperoxidase.**

- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB):  
HTAB (Sigma) ----- 5 g;  
Tampão fosfato de potássio ----- 1 L.

- Peróxido de hidrogênio 0,1%:  
Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec) -----1 mL;  
Água destilada -----29 mL.

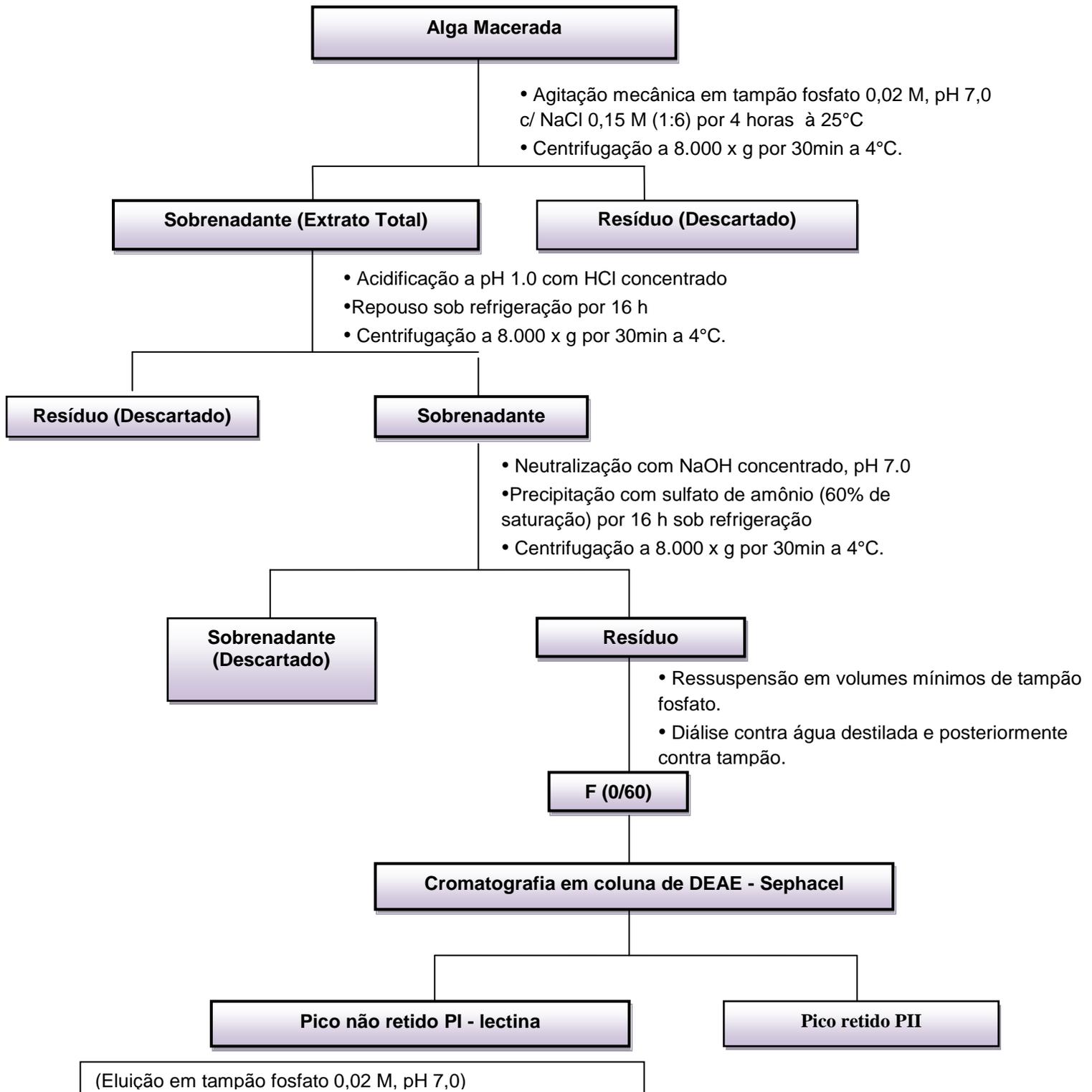
- Solução de o-dianisidina (DDI):  
O-dianisidina (Sigma) -----16,7 mg;  
Tampão fosfato de potássio -----10,0 mL;  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -----50,0 µL;  
Água destilada -----90,0 mL.

## 5 Métodos

### 5.1 Extração e purificação da lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum*.

A extração da lectina da alga marinha Bt foi realizada como descrito previamente por AINOUZ *et al.*,1995. As algas já lavadas e retiradas a umidade foram reduzidas a pó na presença de nitrogênio líquido e submetida a extração protéica, com tampão fosfato de sódio 0,02M, contendo NaCl 0,15M, pH 7.0 na proporção de 1:6 (p:v). O homogenato foi deixado em contato por 4 horas e em seguida filtrado com tecido de nylon. O filtrado obtido foi submetido a centrifugação a 8.000 x g 4°C por 30 minutos. O resíduo foi descartado e o sobrenadante (extrato total), foi então acidificado a pH 1.0 com HCl concentrado e deixado em repouso a 10°C por 16 horas. Esta acidificação foi realizada com o intuito de precipitar a maior parte dos pigmentos presentes na alga. Após as 16 horas o material foi centrifugado a 8.000 x g 4°C por 30 minutos, o precipitado (pigmentos) foi descartado e o sobrenadante teve seu pH ajustado a 7.0 com NaOH concentrado. Após a neutralização, o sobrenadante foi tratado com sulfato de amônio a 60% de saturação, por um tempo de contato de 16 horas a 10°C. Em seguida a suspensão foi submetida a uma última centrifugação a 8.000 x g 4°C por 30 minutos e o precipitado obtido foi ressuspenso em tampão fosfato e dialisado primeiramente com água destilada, exaustivamente, e em seguida contra tampão fosfato. A fração obtida foi então denominada fração F (0/60).

A F (0/60) foi submetida a procedimentos cromatográficos de troca iônica em coluna DEAE – Sephacel, medindo 19 x 2,0 cm. A matriz foi previamente lavada com água para retirada das partículas finas e posteriormente, lavada, sucessivamente, com soluções de NaOH 0,1N, água destilada, HCl 0,1N e água destilada. A coluna foi montada por gravidade e equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7.0. A F (0/60) foi aplicada na coluna. O primeiro pico, não adsorvido a matriz (PI – DEAE), foi obtido pela lavagem da coluna com tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 0,02M, pH 7.0). Durante a cromatografia foi mantido um fluxo constante de 60 ml/h. Os eluatos coletados em frações de 3 ml/tubo, foram monitorados através de medidas de absorbância a 280 nm e pelos ensaios de atividade hemaglutinante.



**FIGURA 2** - Esquema de extração da lectina presente na alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum*.

## 5.2 Determinação da atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante nas frações obtidas durante o processo de purificação da lectina da alga *Bryothamnion triquetrum*, foi determinada através de diluições seriadas em tubos de ensaio. Em cada tubo foram pipetados 100µl de NaCl 0.15M. No primeiro tubo foram adicionados 100µl da amostra e, umas séries de diluições duplas foram feitas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc.), sendo o tubo completamente homogeneizado antes de cada transferência. A cada diluição foram adicionados 100µl de eritrócitos de coelho a 2% (células tratadas com tripsina na proporção de 0,1mg / 10ml de sangue, como descrito por AINOUIZ *et al.*(1992) e a reação foi mantida a temperatura ambiente, por 60 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 2.000 x g por 30 segundos e os resultados foram lidos macroscopicamente, sendo o título expresso em unidade de hemaglutinação (UH/ml), que corresponde ao inverso da maior diluição da amostra que apresentou nítida aglutinação.

## 5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A pureza da lectina foi acompanhada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% na presença de SDS e β-mercaptoetanol, segundo o método de LAEMILLI descrito por HAMES & RICKWOOD, 1983. Para montagem das placas, foi usado um gel de concentração (3,95% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3 x 103mM, pH 6,8 e um gel de separação (acrilamida 12% dissolvida em tampão Tris-HCl 3 x 103mM, pH8,8). A amostra foi dissolvida em tampão Tris-HCl 10mM, pH 8,8 contendo glicerol a 26%, SDS 1%, β-mercaptoetanol 10% e traços de azul de bromofenol. Em seguida, a amostra foi incubada a 100°C por 10 minutos. Alíquotas de 20µL foram aplicadas em poços previamente feitos no gel de concentração. A corrida eletroforética foi realizada a uma corrente constante de 40mA por um período aproximado de 180 minutos. As bandas protéicas obtidas foram reveladas mediante coramento com uma solução de Coomassie R-250 a 2% dissolvido em ácido acético, metanol e água na proporção de (10:45:45) contendo ácido pícrico 0,2M (STEPHANO *et al.*, 1986). Como padrões protéicos, foram utilizadas proteínas de massas moleculares conhecidas: lactoalbumina 14,2 KDa ; inibidor de tripsina 20,1 KDa ; tripsinogênio 24,0 KDa ; anidrase carbônica 29,0 KDa ; gliceraldeído-3-fosfato

desidrogenase 36,0 KDa ; ovoalbumina 45,0 KDa e albumina sérica bovina 66,0 KDa.

## **5.4 Dicroísmo circular (CD)**

### **5.4.1 Composição estrutural da lectina de *Bryothamnion triquetrum* em condições nativas**

As medidas de CD foram realizadas no espectro polarímetro Jasco, modelo J-815 (Jasco Corporation, Japão) em cubetas cilíndricas de quartzo (0,1 cm - caminho óptico). Os espectros foram determinados no intervalo de 190 a 250 nm sob N<sub>2</sub> constante, fazendo-se 8 cumulações para cada amostra à 25 °C. A análise da composição da estrutura secundária da lectina foi então realizada por desconvolução do espectro de CD usando os programas Selcon3, CDSSTR e Continll segundo Sreerama & Woody (2000).

### **5.4.2 Estudo estrutural da proteína submetida a extremos de pH**

Esta metodologia permitiu também o monitoramento das mudanças conformacionais que poderiam ocorrer na proteína em função do pH e da força iônica do meio. Todas as medidas realizadas em CD tinham a proteína na concentração de 0,24 mg/ml, tendo sido utilizados tampão fosfato, acetato, borato 0,02 M, em diferentes pHs (4,0, e 11) para realizar as medidas em CD e analisar a estabilidade da lectina quanto à extremos de pH. Essas medidas foram comparadas às medidas da proteína realizadas sob condições nativas (pH 7,0) para avaliar possíveis alterações estruturais.

## **5.5 Fluorescência**

### **5.5.1 Análise da composição da proteína sob condições nativas**

Para os ensaios de fluorescência foram utilizadas cubetas de quartzo de 0,5ml, cujo caminho óptico a ser percorrido foi de 1 cm, tendo sido realizadas as medidas em Fluorímetro ISSK<sub>2</sub>. A lectina de *Bryothamnion triquetrum* encontrava-se na

concentração de 0,1mg/ml e foi excitada 280 e 295nm para avaliação do espectro de emissão da fluorescência monitorada no intervalo de 300 a 440nm.

### **5.5.2 Avaliação da estabilidade térmica da lectina de *Bryothamnion triquetrum***

A avaliação da estabilidade térmica da lectina de *Bryothamnion triquetrum* por fluorescência nos dois comprimentos de onda (280 e 295nm) foi realizada em diferentes temperaturas que variaram de 25 a 75°C, com intervalos de 10°C. E os espectros obtidos foram comparados ao espectro da lectina sob condições nativas (pH 7,0) e possíveis mudanças conformacionais foram avaliadas.

## **5.6 Estudos da atividade anti-inflamatória**

### **5.6.1 Ensaio do edema de pata induzido por carragenina (Cg) e dextrana**

O modelo do edema de pata induzido por Cg foi realizado segundo o método de WINTER et al., 1962. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: salina(controle negativo), carragenina ou dextran, Lectina + carragenina ou dextran, Indometacina + carragenina ou dextran(controle positivo). A carragenina (500 µg/pata, 100µl) ou dextran (500 µg/pata, 100µl) foram administrados intraplantarmente (ipl.). A lectina foi administrada por via intra-peritoneal(ip) 30 minutos antes da Cg ou dextran, nas doses: 1mg/kg, 5mg/kg e 10mg/kg. O volume da pata traseira direita de cada camundongo foi medido usando pletismômetro (UGO BASILI) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero). Em seguida, foi injetado 0,1 ml do estímulo por via sub-plantar nos animais nessa mesma pata. O volume da pata foi avaliado 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina ou 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 hrs após a injeção do dextran, usando o mesmo pletismômetro. Foram utilizados esses tempos de medição já que o pico do edema induzido por carragenina ocorre na 3ª h após a injeção desse estímulo e o do dextran entre 30 min e 1h após o estímulo. O edema foi calculado como a variação de volume, isto é, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume da pata antes do estímulo inflamatório (tempo zero). No ensaio da carragenina foi feita uma curva dose-resposta para as dosagens de lectina em estudo. A partir dessa curva estimou-se a melhor dose.

### **5.6.2 Ensaio da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg).**

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: salina estéril, carragenina, lectina + carragenina, Indometacina + carragenina (500 µg/pata). Com o objetivo de se avaliar a migração de neutrófilos, foram injetados intraperitonealmente, por cavidade de cada animal, 500 µg de carragenina diluídos em 1,5mL de salina estéril ou apenas 1,5mL de salina estéril. Após quatro horas, a cavidade peritoneal foi lavada com 15mL da solução de PBS heparinizado, massageada e incisada com bisturi para coleta do líquido com pipeta Pasteur. As contagens totais e diferenciais foram feitas de acordo com o método descrito por Souza & Ferreira (1985).

### **5.6.3 Avaliação da atividade de mieloperoxidase da Pata**

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: salina (controle negativo), carragenina, Lectina + carragenina, Indometacina + carragenina (controle positivo). A carragenina (500 µg/pata, 100µl) foi administrada intraplantarmente (ipl.). A lectina foi administrada por via intra-peritoneal(ip), nas doses: 1mg/kg ,5mg/kg e 10mg/kg. Esse experimento foi realizado utilizando 50 mg de pele e tecido celular subcutâneo, por animal, de cada grupo. Essas amostras foram estocadas a -70°C, em eppendorfs de 1,5ml, para posterior dosagem da atividade de MPO no tecido. A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usado como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos. Para tanto, as amostras foram suspensas em tampão de hexadeciltrimetilamônio (pH 6,0; 50mg de tecido por mL de tampão) e depois trituradas com um homogeneizador de tecidos. As amostras foram congeladas, descongeladas e trituradas três vezes. Posteriormente foram centrifugadas a 4500rpm, durante 12min a uma temperatura de 4°C; o sobrenadante foi, então, colhido. Os níveis teciduais da atividade de MPO foram determinados por meio da técnica descrita por Bradley & Cols (1982), utilizando peróxido de hidrogênio 0,0005 % como substrato para MPO. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio a água em 1min a 22°C. No ensaio, á medida que o peróxido de hidrogênio foi degradado

ocorreu à produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianisidina em composto de cor marrom. A variação da densidade óptica da mistura das amostras com a solução de o-dianisidina em função do tempo de reação foi medida por espectrofotômetro à 450nm. Os resultados foram expressos como unidade de MPO/ mg de tecido.

## 6 Resultados e Discussões

### 6.1 Purificação da lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum*

A cromatografia de troca iônica em DEAE-sephacel, da fração 0/60 da alga marinha *Bryothamnion triquetrum*, mostrou a presença de dois picos protéicos (**FIGURA 3**). O primeiro pico (PI-DEAE), eluído com tampão fosfato 0,02M pH 7,0, não retido na coluna, apresentou-se livre de pigmentos e com atividade hemaglutinante. O segundo pico (PII-DEAE), eluído com tampão fosfato 0,02M pH 7,0 contendo NaCl 1M, apresentou-se com baixa atividade hemaglutinante comparado ao pico não retido.

A pureza do pico não retido (PI) foi verificada por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes (SDS- PAGE), cujo peso molecular aparente foi de aproximadamente 14KDa (**FIGURA 4**).

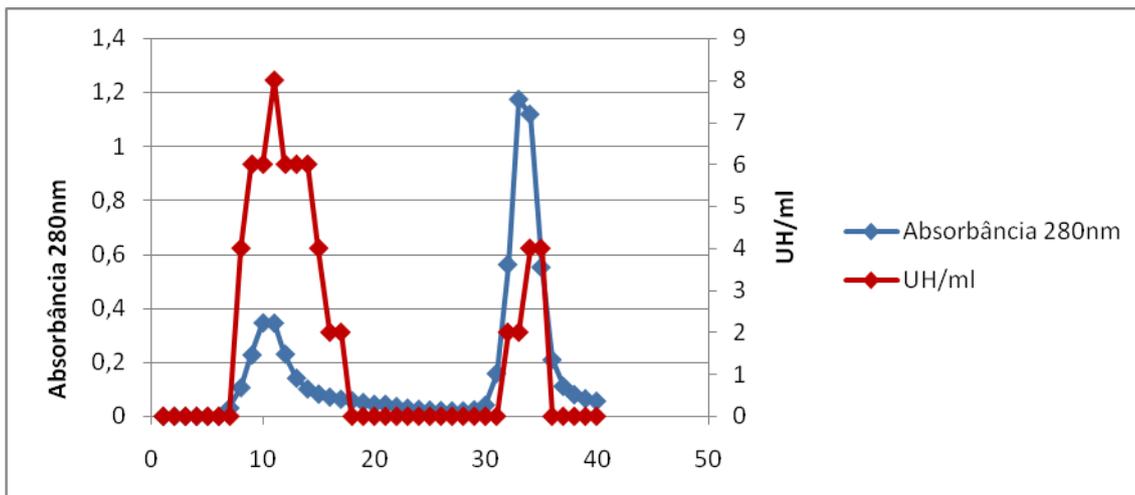
O isolamento da proteína em estudo foi semelhante ao realizado por Ainouz e colaboradores (1995) ao utilizarem cromatografia de troca iônica para a purificação de duas lectinas de algas marinhas vermelhas *Bryothamnion triquetrum* (BT) e *B.seaforthii* (BS), diferindo da técnica realizada, somente, quanto ao tipo de coluna utilizada e algumas estratégias experimentais.

Porém, AINOUZ, et al (1995), encontrou através de filtração em gel uma massa molecular para Bt de aproximadamente 3500 Da. Esse dado diferiu no presente trabalho, em que foi constatado uma massa molecular aproximada de 14KDa para a lectina da alga marinha *Bryothamnion triquetrum* por eletroforese em gel de poliacrilamida.

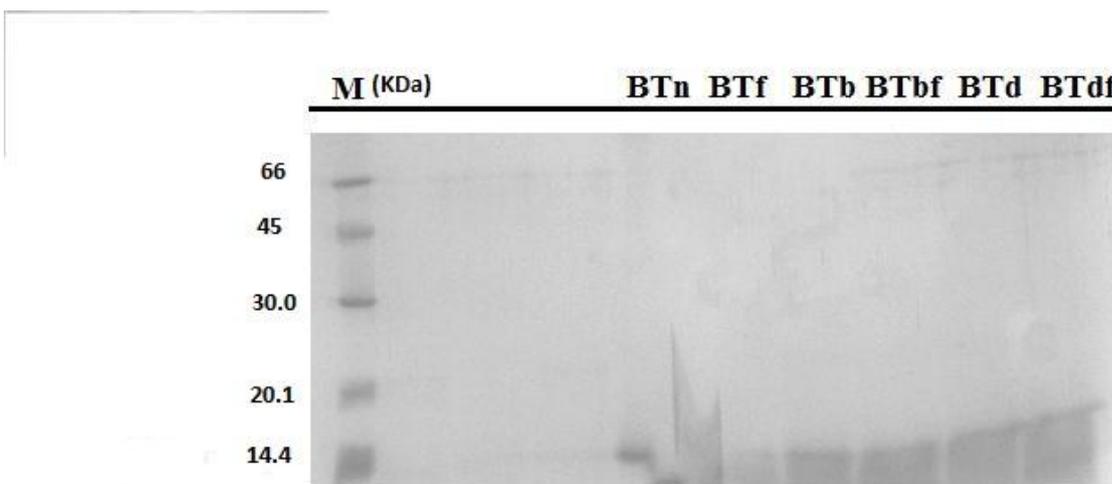
CALVETE *et al.*,2000, encontraram através de SDS-PAGE uma massa aproximada de 16kDa para a lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum*. Porém a estratégia de extração e isolamento foi diferente apenas na utilização da coluna.

VANDERLEI *et al.* (2010), comprovou a pureza da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* PAGE-SDS em presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, onde esta apresentou uma massa molecular aparente de 17kDa, estabelecida por regressão linear em relação aos padrões protéicos utilizados.

A eletroforese mostrou, ainda, que quando submetida à ação dos agentes redutores  $\beta$ -mercaptoetanol (**BTb** e **BTbf**) e Ditiotreititol (**BTd** e **BTdf**) a lectina de *Bryothamnion triquetrum* apresentou somente uma banda que coincide com o peso molecular da proteína sem os agentes redutores (**BTn** e **BTf**), podendo sugerir-se que a mesma é constituída de uma única subunidade.



**FIGURA 3:** Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel da fração F (0/60) da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum*. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato 0,02 M pH 7,0.

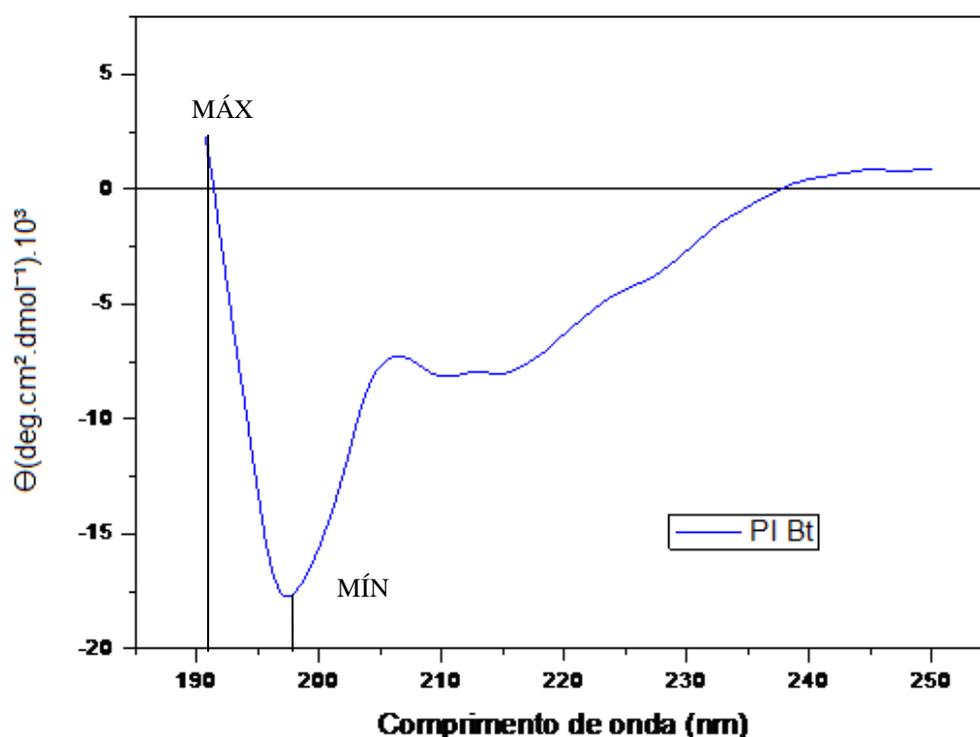


**FIGURA 4:** Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) do PI total. **BTn**: lectina de Bt, **BTf**: lectina Bt fervida, **BTb**: lectina com  $\beta$ -mercaptoetanol, **BTbf**: lectina com  $\beta$ -mercaptoetanol e fervida, **BTd**: lectina com ditiotreititol, **BTdf**: lectina com ditiotreititol fervida. **M (KDa)** corresponde aos marcadores de alto peso molecular utilizados como referência. Foram aplicados 30  $\mu$ l de solução contendo a amostra de interesse em cada poço. Gel corado com Comassie Brilliant Blue R-250.

## 6.2 Análise da Estrutura Secundária da Proteína por Dicroísmo Circular (CD)

O espectro de CD da estrutura secundária da lectina de *Bryothamnion triquetrum* foi realizado com a finalidade de avaliar suas características e composição estrutural, quantidade de  $\alpha$ -hélice, folhas  $\beta$ , voltas e também quanto à estrutura não ordenada. Tendo sido utilizados para a desconvolução do espectro da proteína nativa programas como Selcon3, Contin e CDSSTR (Sreerama & Woody, 2000). Nestes programas espectros de estruturas secundárias de proteínas conhecidas depositadas em bancos de dados foram utilizados de modo comparativo para verificar qual o programa apresentaria uma desconvolução mais satisfatória e confiável.

O espectro de CD da estrutura secundária da lectina da alga marinha *Bryothamnion triquetrum* foi caracterizado por uma emissão mínima perto de 197nm e uma emissão máxima em torno de 190nm. A passagem da banda positiva para negativa acontece em aproximadamente 194nm de emissão e outra passagem para a banda positiva acontece em aproximadamente 236nm de emissão (Figura 5). A emissão máxima da lectina da Bt coincidiu com a emissão máxima da estrutura da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida*, porém diferiu no pico de emissão mínima que foi de aproximadamente 215nm. O espectro da estrutura secundária da lectina de *Bryothamnion triquetrum* em condições nativas pH 7,0 a 25 °C mostrou que esta apresentou-se composta por 3% de  $\alpha$  - hélice, 38% de folha- $\beta$ , 21% de voltas e 37% de estrutura não ordenada, segundo o programa de desconvolução Contin. A lectina da alga vermelha *Amansia multifida* também apresentou em condições nativas nas mesmas condições ser composta por 4% de  $\alpha$  - hélice, 43% de folha- $\beta$ , 21% de voltas e 32% de estrutura não ordenada (MESQUITA, 2010).



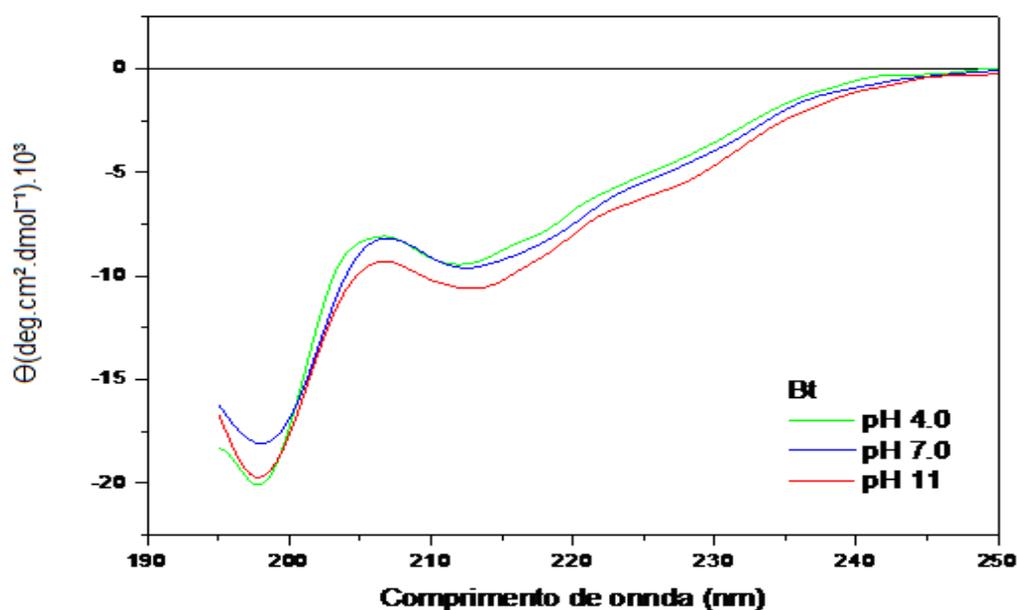
**FIGURA 5** : Espectro de Cd da estrutura nativa. Espectro da estrutura secundária da lectina de *Bryothamnion triquetrum* em condições nativas.

### 6.2.1 Análise da Estrutura frente a extremos de pH

A estrutura secundária da lectina de *Bryothamnion triquetrum* foi analisada por dicroísmo circular, sob extremos de pH (4,0 e 11) e comparadas ao espectro obtido quando a lectina estava em seu estado nativo (pH 7,0). Estes espectros estão representados na **FIGURA 6** e eles podem demonstrar a estabilidade estrutural da proteína quando submetida a esses pH(s), os espectros dos três pHs foram praticamente indênticos. A lectina da Bt também se manteve com o mesmo máximo e mínimo de emissão nas três faixas de pH, corroborando mais uma vez com a alta estabilidade estrutural dessa lectina. Em todas as soluções foram utilizadas quantidades iguais da lectina. Foi realizado o ensaio da atividade hemaglutinante da lectina de Bt, após a incubação desta nos três diferentes pHs, a atividade hemaglutinante da proteína da alga se manteve estável e com sua função ativa em todos os pHs testados, corroborando com o resultado obtido no espectro de

Dicroísmo circular. Essa estabilidade pode ser justificada pela presença de duas pontes dissulfeto intracadeia de padrão 1-2, 3-4 em sua estrutura (CALVETE *et al.*, 2000).

(MESQUITA, 2010) avaliou a lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* por Dicroísmo circular nos extremos de pH 3,0 e 11, e relatou que houve diminuição na intensidade dos espectros nos pHs 3,0 e 11, podendo ser explicado por uma leve precipitação da proteína, já que o perfil do espectro manteve-se semelhante ao original a pH 7,0.



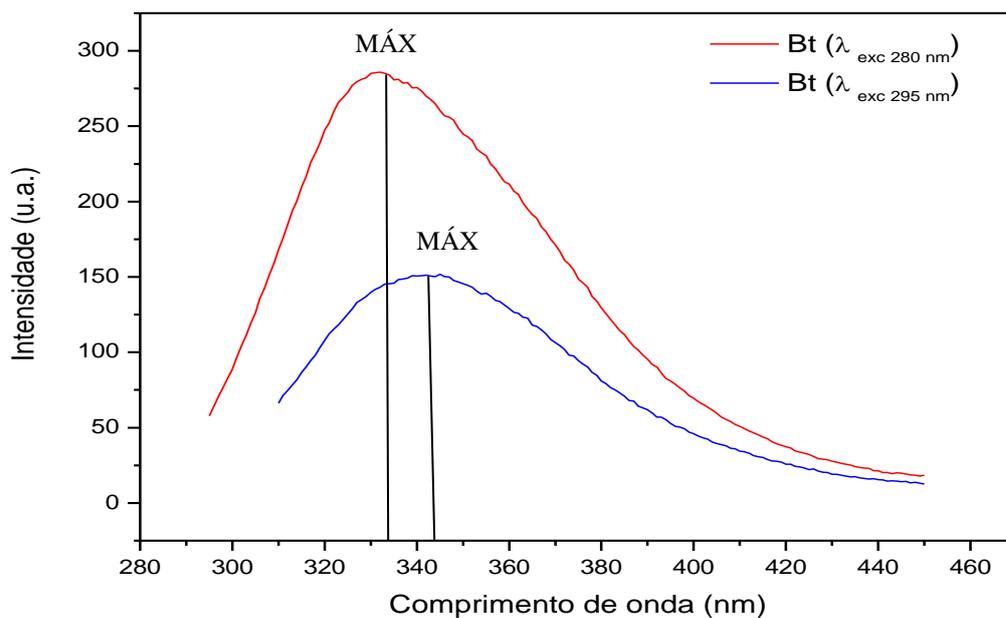
**FIGURA 6:** Efeito do pH na estrutura secundária da lectina de *Bryothamnion triquetrum*. Cada amostra foi incubada por 30 min com o tampão específico para os respectivos pHs (4,0, 7,0 e 11)

### 6.3 Análises da Composição Estrutural da lectina de *Bryothamnion triquetrum* por Fluorescência.

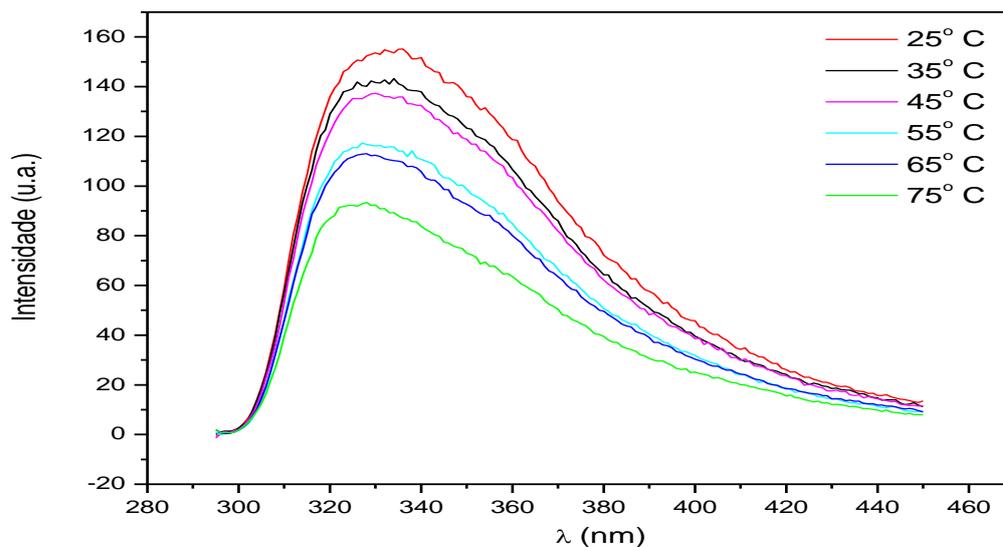
O pico máximo da lec de Bt quando excitado a 280nm foi de aproximadamente 338nm, e quando excitado a 295nm o pico máximo aparente foi de 341nm. Logo a estrutura nativa da Lectina apresentou resultados semelhantes quando excitada em 280 e 295nm, não diferindo significativamente no pico máximo de emissão nos dois espectros analisados. (**Figura 7**).

A presença de pico máximo em torno de 336nm a 344nm é característico da presença de aminoácidos aromáticos, tipo tirosina e triptofano, na estrutura secundária da proteína.

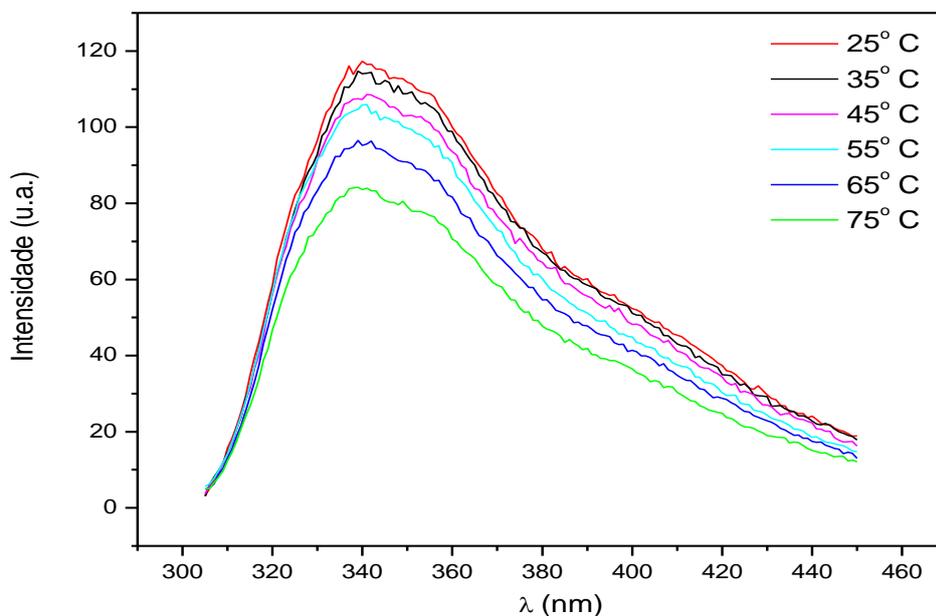
A lectina de Bt foi analisada quanto a sua estabilidade térmica, foi variado a temperatura em 10° de 25 a 75°. Tanto em 280 como em 295nm a lectina manteve sua estrutura estável, sem alteração nos seus picos máximos, quando comparado ao espectro de pH 7.0. Foi observado pequenas alterações na intensidade do sinal, que podem ser devido a a precipitações da amostra. A alta estabilidade observada na estrutura da lec de Bt, pode ser explicada pela presença de duas pontes dissulfeto intracadeia, que conferem a proteína uma maior estabilidade (CALVETE *et al.*, 2000).



**FIGURA 7:** Espectro de emissão de fluorescência da lectina de *Bryothamnion triquetrum* em condições nativas, pH7,0, quando excitada a 280 e 295 nm



**FIGURA 8:** Efeito da temperatura na estrutura secundária da lectina de *Bryothamnion triquetrum* por fluorescência. Lectina em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0. A concentração final era de 0,11mg/ml, esta foi incubada em cada temperatura (25 a 75 ° C, elevadas de 10 em 10° C). Excitação de 280nm.



**FIGURA 9:** Efeito da temperatura na estrutura secundária da lectina de *Bryothamnion triquetrum* por fluorescência. Lectina em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0. A concentração final era de 0,11mg/ml, esta foi incubada em cada temperatura (25 a 75 ° C, elevadas de 10 em 10° C). Excitação de 295nm.

## 6.4 Estudos da atividade anti-inflamatória

### 6.4.1- Efeito da lectina sobre o edema de pata induzido por carragenina.

O edema de pata induzido por carragenina 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 lectina foi administrada por via ip (intraperitoneal) em três diferentes doses: 1mg/kg, 5mg/kg e 10mg/kg no intuito de observar seu possível efeito sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos e analisar a partir de uma curva dose-resposta a melhor dose da lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum*. E como controle positivo, utilizou-se indometacina (Indo) na dose de 10mg/kg.

Como podemos observar na tabela 2 (curva dose-resposta), as três doses da lectina inibiram significativamente,  $p < 0,05$ , o edema de pata induzido por carragenina. O pré – tratamento com a lectina na dose de 10mg/kg (melhor dose) foi o mais eficiente, diminuindo cerca de 73%, 100%, 98% e 91% na 1, 2, 3 e 4 hora, quando comparado com o controle positivo Cg. As doses de 1 e 5mg/kg inibiram em média 70% e 81%, respectivamente. Sendo mais eficientes na terceira hora com, 80% de inibição na dose de 1mg/kg e 85% de inibição na dose de 5mg/kg. Similarmente, a Indometacina inibiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a resposta edematogênica evocada pela Cg na 1<sup>o</sup>; 2<sup>o</sup>; 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> h, apresentando um percentual médio de redução em 83%.

A figura 10 mostra o gráfico do ensaio de edema de pata induzido por carragenina com a dose de 10mg/kg, a melhor dose. De acordo com o gráfico o grupo carragenina provocou um edema intenso atingindo seu pico na terceira hora, após a administração, e se mantendo até a quarta hora.

VANDERLEI et al., 2010, avaliando o efeito anti-inflamatório de uma lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides*, verificaram que o pré-tratamento i.v (intravenoso) com essa lectina na dose de 9mg/kg inibiu o edema de forma significativa principalmente na terceira hora.

A lectina isolada da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea* também mostrou ser capaz de inibir, significativamente, o edema de pata induzido por carragenina, porém foi menos eficiente quando comparado ao controle positivo (Dexametasona) (SILVA et al, 2010).

O resultado obtido com a administração da lectina (Bt) teve um efeito melhor quando comparado aos resultados encontrado das lectinas das algas *Caulerpa cupressoides* e *Pterocladia capillacea*.

A lectina da alga marinha vermelha *Hypnea cervicornis* foi capaz de inibir o edema de pata induzido por carragenina, em uma única dose testada (1mg/kg), em 72% (BITENCOURT et al., 2008).

Também foram encontrados com o uso de lectinas isoladas de sementes brasileiras (ASSREUY et al., 1997) (GADELHA et al., 2006) (ALENCAR et al., 2009) e de lectinas de leguminosas um efeito significativo na redução do edema (ALENCAR et al., 1999) (ROCHA et al., 2011) (LEITE et al 2012).

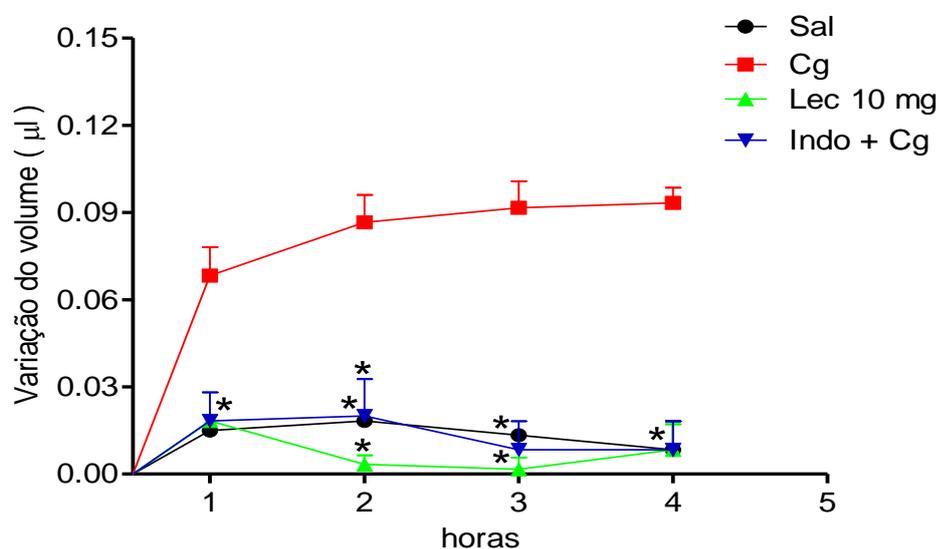
Segundo Di Rosa et al. (1971), o edema provocado por esse agente flogístico ocorre em três fases. Na primeira hora após a injeção de carragenina, o aumento da permeabilidade vascular é mediado por histamina e serotonina. Na segunda hora, esse aumento é mediado pela bradicinina. A fase de maior intensidade do edema ocorre três horas após a injeção de carragenina e caracteriza a ação de prostaglandinas e leucotrienos sobre a permeabilidade capilar.

A inibição do edema de pata por todas as doses testadas, sendo mais eficaz na dose de 10mg/kg, e em todas as horas do ensaio de edema de da lectina da alga marinha *Bryothamnion triquetrum*, sugere que a proteína pode estar interferindo com a liberação de uma cascata de mediadores inflamatórios. Portanto, provavelmente, a resposta antiedematogênica da lectina está relacionada com eventos inflamatórios que envolvem a migração de neutrófilos.

Tabela 2. Efeito da lectina sobre o edema da pata induzido por carragenina em camundongos.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Edema de pata (ml)			
		1 h	2 h	3 h	4 h
<b>Controle (Cg)</b>		0,068±0,004	0,086±0,005	0,091±0,004	0,093±0,002
<b>Salina</b>		0,015±0,005	0,018±0,004	0,013±0,008	0,008±0,004
<b>Indometacine</b>	10	0,018±0,004*** (73,044)	0,020±0,005*** (76,744)	0,008±0,004*** (90,879)	0,008±0,004*** (91,075)
<b>Lectina</b>	1	0,036±0,011** (47,058)	0,020±0,007*** (76,744)	0,017±0,014*** (80,769)	0,024 ± 0,008*** (74,193)
	5	0,016±0,007*** (75,485)	0,015±0,006*** (82,558)	0,013±0,007*** (85,384)	0,018±0,008*** (80,322)
	10	0,018±0,004*** (73,044)	0,003±0,002*** (99,965)	0,016±0,001*** (98,175)	0,008±0,004*** (91,075)

Os valores de edema de pata são expressos em média ± SEM (n = 5). A % de inibição de edema de pata é indicado entre parênteses. Controle Cg = carragenina.  
\*\*\* P <0,05 comparado com controle (ANOVA seguido por teste de Bonferroni).



**Figura 10 - Efeito da lectina sobre o edema de pata induzido por carragenina.** - Cg: grupo que recebeu apenas Cg (500 µg/pata); Sal: grupo que recebeu apenas NaCl ; Indo + Cg: grupo que recebeu pré-tratamento (1 h antes da Cg) com indometacina; e Lec 10: grupo que recebeu pré-tratamento (30 min antes da Cg) com Lectina na dose de 10 mg/kg;i.p. 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).

#### 6.4.2 Efeito da lectina sobre o edema de pata induzido por dextrana.

A dextrana é um agente pró-inflamatório que promove a liberação de aminas vasoativas, como a histamina e serotonina causando um edema osmótico, sendo caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular e ocasionando baixos níveis de proteínas e de neutrófilos (LO et al., 1982). Logo, esse modelo foi utilizado para avaliar se a Lec 10mg/kg (melhor dose) também é capaz de reduzir um edema osmótico, além do celular induzido por Cg.

Como mostrado na figura 9, a administração da dextrana (500ug/pata) atingiu um pico máximo, comparado ao grupo salina, nos primeiros 30 minutos, sendo seu efeito reduzido nas horas posteriores do ensaio.

O tratamento com a lectina da alga Bt, na dose de 10mg/kg, demonstrou ser eficaz em reduzir a formação do edema induzido por Dextrana, de maneira significativa, ( $p < 0,05$ ), em todo o período do experimento. Nos primeiros 30 minutos a lectina exibiu um percentual de redução de 90,24%, apresentando uma inibição maior que o grupo Indometacina (controle) que inibiu 46,34% o edema de pata induzido por dextrana. Na primeira hora a lectina apresentou inibição de 89,28% e na segunda, terceira e quarta hora a inibição da lectina da alga Bt foi de 100%.

A Indometacina (10mg/kg) reduziu também o edema em todo o intervalo do experimento, sendo significativa,  $p < 0,05$ . Porém a Indometacina só reduziu o edema em 100% na quarta hora após a injeção da carragenina. Mostrando mais uma vez a melhor eficácia da lectina da *B. triquetrum*, comparada ao grupo controle Indometacina.

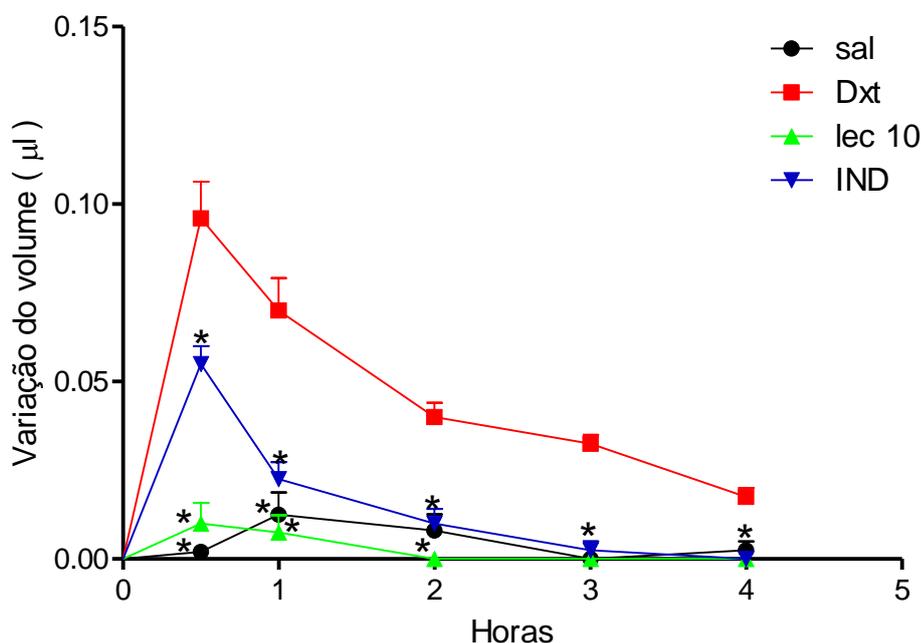
A literatura é escassa em relação às lectinas de algas que tenham algum efeito sobre o edema de pata induzido por dextrano. A lectina da alga marinha vermelha *Hypnea cervicornis* não foi capaz de inibir o edema de pata induzido por dextrana em nenhuma das doses testadas (BITENCOURT et al., 2008).

ABREU, 2012 relatou o primeiro estudo de lectina de alga marinha que diagnosticou uma inibição do edema de pata induzido por dextrana. A lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* inibiu o edema em todas as doses testadas (1,3 e 9 mg/kg) em 48,36 e 45%, respectivamente no pico da dextran (30 minutos). Não havendo diferença, significativa, entre as três doses testadas.

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 H1, H2, H3 e H4, sendo que os receptores H1 estão localizados, entre outros locais, nos vasos sanguíneos; os H2 localizam-se predominantemente na mucosa gástrica; os H3 são frequentemente expressos no SNC; e os H4 são encontrados em células hematopoiéticas periféricas como eosinófilos, neutrófilos e células TCD4+ (MAINTZ; NOVACK, 2007; RABER, 2007). Fármacos como a loratadina, a cimetidina e a tioperamida agem especificamente nos receptores H1, H2 e H3, respectivamente (THURMOND; GELFAND; DUNFORD, 2008).

É possível sugerir que a lectina da Bt atue inibindo a liberação de serotonina ou de histamina ou atue bloqueando receptores serotoninérgicos ou histaminérgicos, possuindo assim, atividade sobre os eventos vasculares da inflamação.



**Figura 11 - Efeito da Lec sobre o Edema de Pata Induzido por Dextrano em Camundongos.** Dxt: grupo que recebeu apenas dextrano (500 µg/pata); Sal: grupo que recebeu apenas NaCl; Ind: grupo que recebeu pré-tratamento (1 h antes da Cg) com indometacina e Lec 10 : grupo que recebeu pré-tratamento (30 min antes da Cg) com Lec na dose de 10 mg/kg;i.p. 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 Dxt (ANOVA, Teste de Bonferroni).

### 6.4.3 Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

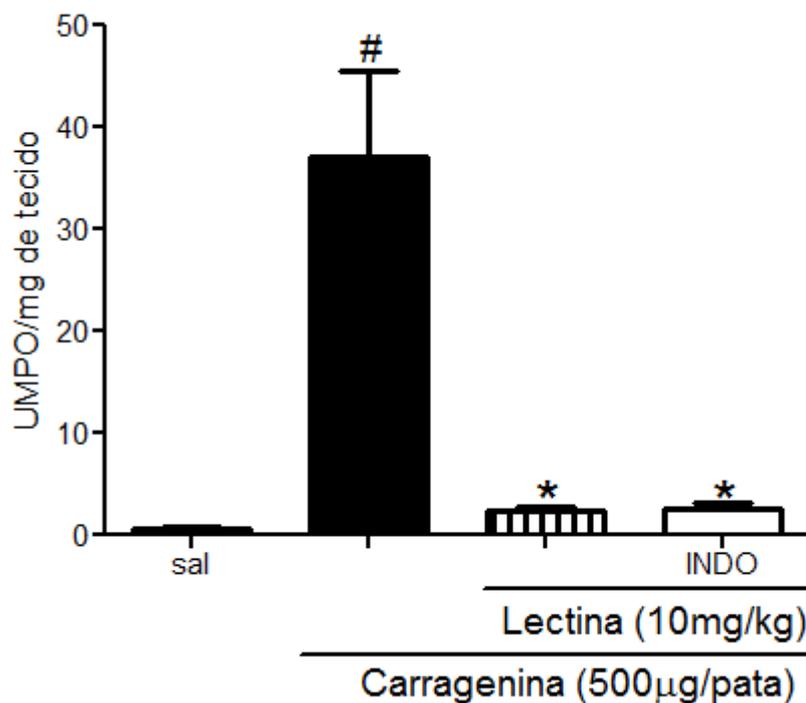
Mieloperoxidase é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios (POSADAS et al., 2004). Portanto o aumento da atividade da MPO é um importante indicativo da progressão do processo inflamatório.

Para confirmar a ação anti-inflamatória da Lec, foi dosada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) nos sobrenadantes dos homogenatos das secções das patas dos camundongos de todos os grupos do ensaio do edema de pata induzido por carragenina.

Na figura 10 é mostrado que os animais tratados com a lectina de Bt na dose de 10mg/kg, foi capaz de inibir a atividade da MPO em 92,93% quando comparada com os animais tratados somente com a carragenina. Os animais tratados com indometacina reduziram a atividade da enzima em 92,65%, resultado semelhante ao da lec10. Logo, a indometacina também foi eficaz em inibir a atividade da MPO.

Portanto este resultado corrobora com o de edema de para induzido por carragenina, que mostrou também uma eficácia na atividade anti-inflamatória na dose de 10mg/kg.

Resultados semelhantes foram encontrados em lectinas de sementes de *Luetzelburgia auriculata* (ALENCAR et al., 2009) . Assim também como, na lectina isolada da alga marinha vermelha *Hypnea cervicornis*, que apresentou uma diminuição significativa,  $p < 0.005$ , na atividade da enzima mieloperoxidase (FIGUEIREDO et al., 2010). ABREU et al., 2012 mostrou resultado semelhante na lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*, que reduziu a atividade dessa enzima em 60, 73 e 88% nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg, respectivamente, se mostrando semelhante a lectina da alga marinha *Bryothamnion triquetrum*.



**Figura 12 - Atividade da Mieloperoxidase (MPO) nos Líquidos Peritoneais Coletados no Ensaio de Migração Celular.** - grupo que recebeu apenas Cg (500 µg/cav;i.p.); Sal: grupo que recebeu apenas NaCl (i.p.); Indo: grupo que recebeu pré-tratamento (1 h antes da Cg) com indometacina (1 mg/kg;i.p.); e Lec 10: grupo que recebeu pré-tratamento (30 min antes da Cg) com Lec na dose de 10mg/kg;i.p. 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 Cg (ANOVA, Teste de Bonferroni).

#### 6.4.4 Efeito da Lectina de Bt sobre a Migração de Neutrófilos em Cavidade Peritoneal Induzida por Carragenana

A carragenana induz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal por um mecanismo indireto, através da ativação de macrófagos. A inibição da migração de neutrófilos para o local da inflamação é o mecanismo central de ação de alguns fármacos anti-inflamatórios (Souza et al. 1988).

Quando administrada por via i.p. em camundongos, a Lec, na dose de 10 mg/kg, reduziu significativamente a migração de leucócitos totais, com uma taxa de inibição da migração de 91,84% (FIGURA 11). O controle positivo indometacina também inibiu significativamente essa migração em 86,82%, ( $p < 0,05$ ).

Com relação à contagem diferencial, a Lec (10 mg/kg) também reduziu significativamente a migração de neutrófilos, sendo a taxa de inibição de 92,02% (FIGURA 12). Corroborando com os resultados obtidos na contagem total. Também não houve diferença significativa entre a inibição da Lec (10 mg/kg) e do controle positivo indometacina, que inibiu 82,98% da migração de neutrófilos.

Não foi avaliado, ainda, o mecanismo de ação que está envolvido na redução da migração de neutrófilos, mas se pode sugerir que a lectina 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.

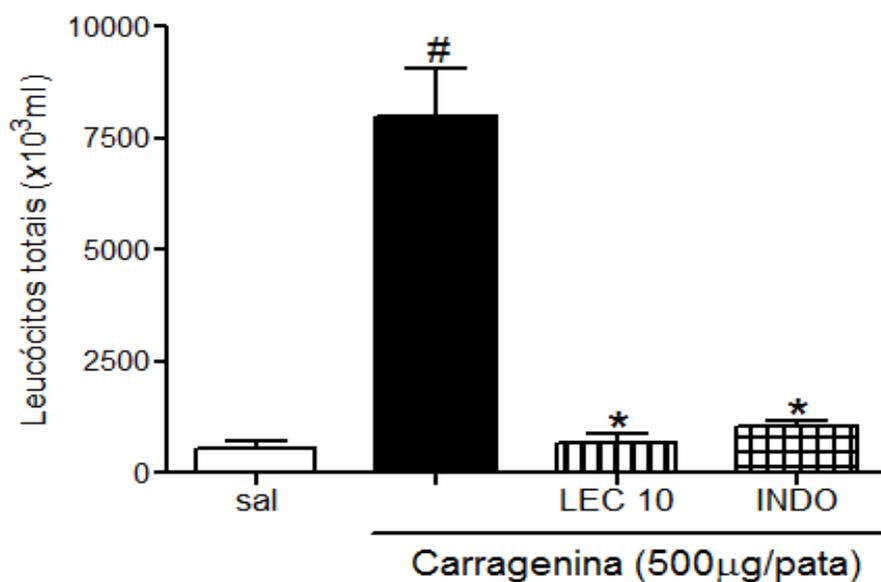
Entretanto esse resultado difere dos encontrados por NEVES *et al.*, 2001, em que a lectina da alga *B. triquetrum* foi capaz de induzir a migração de neutrófilos na dose de 13ug/ml i.p, se mostrando como uma lectina inflamatória, porém seus mecanismos de ação são desconhecidos. Essa diferença se pode justificar pela diferença discrepante nas doses utilizadas ou pelo método de extração e purificação das proteínas.

No entanto, 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).

A lectina da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea* (Pc) na dose de (8,1mg/kg i.v) foi capaz de diminuir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal do rato em 84%, porém o efeito inibidor da migração de neutrófilos da Pc foi inferior ao observado para a administração prévia do controle positivo dexametasona (SILVA *et al.*, 2010). A lectina da alga *Caulerpa cupressoides* (9 mg/kg) também foi capaz de inibir essa migração em 65,9% (VANDERLEI, 2010).

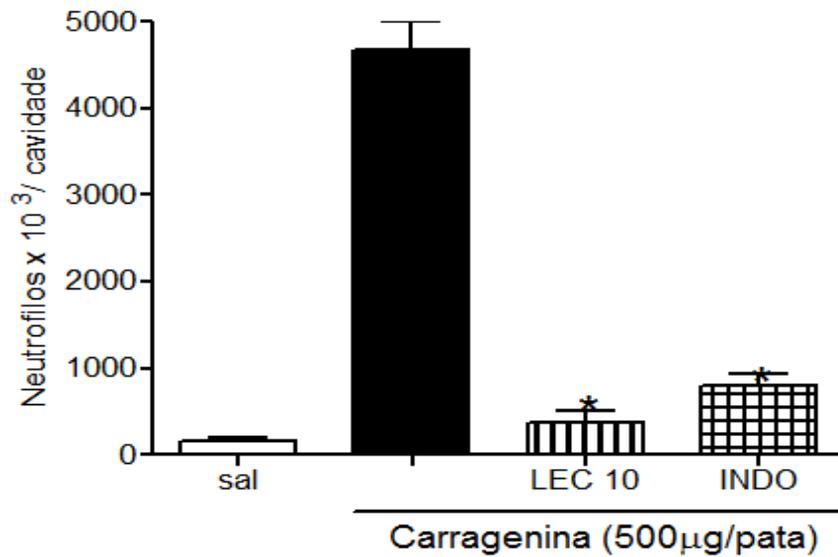
Recentemente foi relatado que a lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg, reduziu significativamente e de forma dose-dependente a migração de leucócitos totais, com uma taxa de inibição da migração de 39,7; 67,9 e 76,2%, respectivamente (ABREU, 2012).

Logo, são resultados semelhantes aos encontrados com a lectina da alga *B. triquetrum* estudada no presente trabalho.



Fi

**gura 13 - Efeito da Lec sobre a Migração de Leucócitos Totais Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Camundongos.** Os animais (n=5) foram tratados antes da aplicação do estímulo inflamatório carragenana (500 µg/cav; i.p.) com indometacina (1 mg/kg; i.p.; 1h) e Lec (10 mg/kg; i.p.; 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 leucócitos totais x10<sup>3</sup>/mL de fluido peritoneal. \**p*<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo carragenina (ANOVA, Teste de Bonferroni).



**Figura 14 - Efeito da Lec sobre a Migração de Neutrófilos Induzida por Carragenana (Cg) na Cavidade Peritoneal de Camundongos.** Os animais (n=5) foram tratados antes da aplicação do estímulo inflamatório carragenana (500µg/cav; i.p.) com indometacina (1 mg/kg; i.p.; 1h) e Lec (10 mg/kg; i.p.; 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 x10<sup>3</sup>/mL de fluido peritoneal. \**p*<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo carragenana (ANOVA, Teste de Bonferroni)

## 7 Conclusão

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que a lectina extraída da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* apresentou uma estrutura estável tanto em extremos de pH (4,0 – 11,0) como a temperaturas mais elevadas (até 75°C). Mostrando-se também composta de aminoácidos aromáticos como, triptofano e tirosina na sua estrutura secundária. Somando-se a isso essa mesma substância mostrou potencial anti-inflamatório frente a modelos clássicos de inflamação aguda.

Assim estudos posteriores necessitam ser executados na intenção da elucidação dos possíveis mecanismos pelos quais essa substância produz anti-inflamação.

## Referências

ABREU, T.M. **Efeitos da lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson na Nocicepção e Inflamação em animais.** 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2012.

AINOUZ, I. L *et al.* Agglutination of enzyme treated erithrocytes by brazilian marine algal extracts. **Botânica Marina.** v. 35, p. p. 475-479, 1992.

AINOUZ, I. L *et al.* Mapurunga S. Comparative study on hemagglutinins from the red alga *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 7 (1):** 15-19, 1995.

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

ALENCAR, N.M.N *et al.* An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leucocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammations models. **Inflammation Research,** (2010) 59:245–254.

ANDRADE, F.K. **Purificação e Caracterização parcial da lectina presente na alga marinha verde *Cladophora vagabunda* (L.) HOEK.** MONOGRAFIA (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2004.

ARMISEN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology** 7:231-243, 1995.

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

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-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2008;377:139–48.

BORREGAARD, N; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leucocyte. **Blood**, v.89, p. 3503 – 3521, 1997.

BORREGAARD, N *et al.* Neutrophils and keratinocytes in innate immunity-cooperative actions to provide antimicrobial defense at the right time and place. **J Leukoc Biol**, v. 77, 2005.

BOYD, W.C.; ALMODIVAR,L.R. & BOYD, L.G. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**. **6**: 82-83,1966.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.

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

BROEKAERT,W.F., NSIMBA-LUBAKI,M., PEETERS,B. & PEUMANS, W. A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.,) bark. **Biochemical Journal**, **221**: 163-164, 1984.

CALVETE, J.J *et al.* The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marina algae *Bryothaminion triquetrum* defines a novel lectin struture. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v.57,p.343-350, 2000.

CARDOZO, K. H. *et al.*, Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology** , v.146, p. 60-78, 2007.

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.

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

CUMMINGS, R.D. Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. In glyco-sciences, status and perspectives. Edited by Gabius, H.J. & Gabius, S. Chapter 10. **Published by Champman & Hall GmbH**, Weinheim, Germany, p. 191-199, 1997.

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

ETZLER, M.E. Plant lectins molecular and biological aspects. **Ann. Ver. Plant. Physiol.** **36**: 209-234, 1985.

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, C, D, T. **Identificação, Purificação, Caracterização e Atividade Biológica de Proteínas do Látex de *Calotropis procera* envolvidas na Defesa da Planta**. Tese (Doutorado em Bioquímica) apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 190 pp. Fortaleza, 2009.

GADELHA, T.S *et al.* Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 350 (2006).

GALLI, S.J; NAKAE, S; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nat. Immunol.**v.6, 2006.

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.

GILETTO A., C.N. PACE, IN: N.C. Price (Ed.), Protein Stability in Proteins Labfax, **Bios Scientific Publishers**, Oxford, pp. 233-239, 1996.

GILMAN,A.G; GOODMAN,L.S; RALL,T.W; MURAD,F. **Goodman & Gilman`s the pharmacologicas basis of therapeutics.** 11a edição, Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

GOLDSTEIN, I.J. *et al.* Should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p.60, 1980.

HAJARE, S.W *et al.* Anti-inflammatory activity of *Dalbergia sissoo* leaves. **Fitoterapia**, v.72, 2001.

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

HAMPTON, M.B; KETTLE, A.J; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood**, v.92, 1998.

HARNEDY, P. A.; FITZGERALD, R. J. Bioactive proteins, peptides and amino acids from macroalgae. **J Phycol**, v. 47, p. 218-232, 2011.

HELLIN, H. Thesis, University of Dorpat, 1891. Citado por **BARBIERI et. al., 1993**. 1981.

HORI, K.; MATSUBARA, K.; KEISUKE, M. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red algae, *Hypnea japonica*. **Biochemica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1474,p.226-236, 2000.

HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia**, v. 204/205, p. 561-566, 1990.

JOHNSON C.M., A.R. FERSHT, Protein stability as a function of denaturant concentration: the thermal stability of barnase in the presence of urea, **Biochemistry** 34; 6795–6804 (1995).

JOSEPH R. LAKOWICZ. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, Third Edition, p. 5-25 2006.

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

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 9<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

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

LAINE, R.A. A calculation of all possible oligosaccharide isomer, both branched and linear yields  $1.05 \times 10^{12}$  structures or a reducing hexasaccharide: the isomer barrier to develop of single method saccharide sequencing or synthesis systems. **Glycobiology**, v. 4, p. 19, 1994.

LEES, P; LANDONI, M.F; GIRAUNDEL, J; TOUNTAIN, P.L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.27, 2004.

LEITE, J.F.M. *et al.* Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of a Lectin-Like Substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard Seeds. **Molecules**, 2012, 17, 3277-3290.

LEY, K *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade update. **Nat Rev Immunol**, v.7.2007.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.

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

LOPES, J.L.S *et al.* Physico-chemical and antifungal properties of protease inhibitors from *Acacia plumosa*. **Phytochemistry** 70 (2009) 871–879.

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.

LUCAS, S.M; ROTHWELL, N.J; GIBSON,R.M; The role of inflammation in CNS injury and disease. **Br.J. Pharmacol.**, v.147, 2006.

MAINTZ, L.; NOVAK N. Histamine and histamine intolerance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 1185-1196, 2007.

MARSHALL, J.S. Mast-cell responses to pathogens. **Nat. Rev. Immunol.** v.4, 2004.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, 2008.

METZ, M *et al.* Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. **Immunol.Rev**, v.217, 2007.

METZ, M; MAURER, M. Mast cells key effector cells in immune responses. **Trend immunol**, 2007.

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

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

NASCIMENTO, K.S *et al.* Isolation and characterization of a new agglutinin from the red marine algae *Hypnea cervicornis*. **J Agardh Biochem Cell Biol** 2006;84:49–54.

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

NELSON, D.L., COX, M.M. Lenhinger Princípios de Bioquímica. 3a ed. São Paulo. **Savier**, p. 975, 2002.

NEVES, S.A *et al.* Neutrophil migration induced in vivo and in vitro by marine algal lectins. **Inflammation Research**, 50 (2001) 486–490.

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.

OGAWA, S. *et al.* Histamine responses of large neostriatal interneurons in histamine H1 and H2 receptor knock-out mice. **Brain. Res. Bull.**v.78,2009.

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

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

PEUMANS & VAN DAMME, Proposal FOR A Novel Sistem of Nomeclature of Plant Lectins, **Lectins**, **10**:105-117, 1995.

PHILLIPSON, M *et al.* Intraluminal crawlingof neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. **J Exp Med**, V.203,2006.

POSADAS, I *et al.* Carrageenen-induced mouse paw edema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br. J. Pharmacol.**, v.142,2004.

PURVES, W; SADAVA, D; ORIAN, G; HELER, H. **Vida A ciência da Biologia**, Artmed 6° edição, 2002.

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

RANG, H.P *et al.* **Biologia Vegetal**. 7a edição. Editora Guanabara Koogan S.A , Rio de Janeiro, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6ª ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 906p, 2001.

RIBEIRO, R. A *et al.* Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur. J. Pharmacol.** **391**: 97-103, 2000.

ROCHA, B.A.M *et al.* Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. **Biochimie** 93 (2011) 806e816.

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.; LOVELESS, R. W.; BALDING, P. Isolation and characterization of the lectins from sub-species of *Codium fragile*. In **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** v. 5, p. 155-160, 1986.

ROTH, J *et al.* Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunol. Allergy Clin. N. Am.**, v.29,2009.

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

SAHA, P; GEISSMANN, F. Toward a functional characterization of blood monocytes. **Immunology and Cell Biology**. V.89, 2011.

SCOTT, D. T.; LAM, F. Y.; FERRELL, W. R. Acute Joint Inflammation - Mechanisms and Mediators. **Gen Pharmac**, v. 25, p. 1285-1296, 1994.

SERHAN, C.N; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the and. **Nature Immunol**, v. 6, 2005.

SHARON M. K., THOMAS J. J., NICHOLAS C. P. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta** 1751. 119 – 139, 2005.

SHARON M. K., NICHOLAS C. P. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function **Current Protein and Peptide Science**, 1, 349-384, 2000.

Sharon, N. Lectins: past, present and future. **Biochem. Soc. Trans.** 36 1457–1460, 2008.

SHARON, N. & LIS, H. **Lectins**. 126p. Chapman and Hall, London, 1989.

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

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER\_KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SILVA, L.M.C.M *et al.* Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocladia capillacea*. **Biol. Pharm. Bull.** 33(5) 830—835 (2010).

SMIT, J. A.; Medical and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Jornal of Applied Phycology**, 16:245-262, 2004.

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

SOUZA, B.W.S. *et al.* Haemagglutinin of the antarctic seaweed *Georgiella conXuens* (Reinsch) Kylin: isolation and partial characterization. **Polar Biol** (2010).

SOUZA, G.E *et al.* Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions** 24:377–380, 1988.

SPINOSA, H.S; GÓRNIK, S.L; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 4ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S.Y.; WOODY, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis, **Anal. Biochem.** **287**: 243–251(2000).

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

STELEKATI, E; ORINSKA, Z; BULFONE-PAUSZ, S. Mast cells in allergy: innate instructors of adaptive responses. **Immunobiol**, v.212, 2007.

STILLMARK, H. Uben ricin, ein giftiges ferment aus samen von ***Ricinus communis*** L., und einigen anderen euphorbiaceen. Tese de Doutorado, Universidade de Dorpat, Dorpat (Tartu), 1888.

STITES, D.P; TERR, A.J. **Imunologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Prentice-Hall do Brasil LTDA, 1992.

TARRANT, T.K; PATEL, D.D. Chemokines and leucocyte trafficking in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v.13, 2006.

TEIXEIRA, C.F.P; LANDUCCI, E.C.T; ANTUNES,E; CHACUR,M; CURY,Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipase A2. **Toxicon.**, v.42, 2003.

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.

VAN DAMME, E.J.M., ALLEN, A.K. & PEUMANS, W.J. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthun nivalis*) bulbs. **Febs Letters**, **215** (1)140-144, 1987a.

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

VAN PARIJS, J. *et al.* Hevein: antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasilienses*) latex. **Planta**, v.183, p. 258-262, 1991.

VIANA, G.S.B. *et al.* Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. And *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, (2002), 35:713-722.

VIDOTTI, E.C; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quim. Nova**, Vol. 27, No. 1, 139-145, 2004.

VODOVOTZ, Y. *et al.* Translational systems biology of inflammation. **PLoS Computational Biology**, 2008.

WEBER, A; KNOP, J; MAURER, M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. **Br. J. Dermatol**, v.148,2003.

WHITTAKER, R.H. New concepts of Kingdoms of organisms. **Science** **163**: 150-160, citado por Câmara (1994), 1969.

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

WYNNE, M. J. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western atlantic: first revisio (Nova Hedwigia). **J. Cramer**, 150 p, 1998.

ZHOU, H. Y. *et al.* Anti-inflammatory activity of 21 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-methykmelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, v. 572, p. 239-248, 2007.