



Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

JOZI GODOY FIGUEIREDO

**POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DA LECTINA
DE SEMENTES DE *Canavalia boliviana* PIPER: MECANISMOS E
MEDIADORES ENVOLVIDOS.**

FORTALEZA

2010

JOZI GODOY FIGUEIREDO

**POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DA LECTINA DE
SEMENTES DE *Canavalia boliviana* PIPER: MECANISMOS E MEDIADORES
ENVOLVIDOS.**

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

Orientador: Prof. Dr. BENILDO SOUSA CAVADA

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a NYLANE MARIA NUNES DE ALENCAR

**Fortaleza
2010**

Esta Tese foi apresentada a coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em bioquímica pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se disponível a todos os interessados na Biblioteca central desta Universidade.

É permitida a transcrição desta Tese, desde que seja feita de acordo com as normas de ética.

Jozi Godoy Figueiredo

Tese aprovada em 05/03/2010

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

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

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dra. Tatiane Santi Gadelha
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Prof. Dra. Erika Mota
Universidade Federal do Ceará- UFC

**POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DA LECTINA DE
SEMENTES DE *Canavalia boliviana* PIPER: MECANISMOS E MEDIADORES
ENVOLVIDOS.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Parte desta tese está publicada no Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology volume 380: 407-414, 2009.

Jozi Godoy Figueiredo

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

Dedico.

**Que as desilusões não destruam os sonhos,
Que os obstáculos não impeçam a caminhada,
Que as barreiras nos impulsionem a luta,
Porque acima de tudo é preciso acreditar.**

**As grandes mentes discutem idéias, as
medianas os acontecimentos e as pequenas
pessoas.**

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Nesses três anos de duração do doutorado muitos caminhos foram trilhados, alguns difíceis outros extremamente gratificantes, porém todos eles proporcionaram uma nova forma de aprender a ver e viver a vida. Desta forma agradeço:

Ao meu orientador Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada por me acolher em seu grupo de pesquisa e sua contribuição para minha formação científica.

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

Ao Prof. Dr. Fernando Cunha pela atenção dispensada em seu laboratório contribuindo com o êxito deste trabalho e que pela disponibilidade de aceitar participar desta banca examinadora.

A Prof^a. Dr^a Tatiane Santi Gadelha pela presença constante durante a jornada da pós graduação, pelas idéias e pensamentos compartilhados e que prontamente aceitou participar desta banca examinadora.

A Prof^a. Dr^a Érika Mota pela atenção, ensinamentos desde a época do mestrado e que gentilmente aceitou participar desta banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Thiago Cunha pela amizade e pela valiosa contribuição na realização deste trabalho.

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

Ao Prof. Sérgio Henrique Ferreira pelas sugestões e ensinamentos no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Mario Rogério Mota pela contribuição desde a época em que fomos colegas de laboratório até o momento; agradeço pelo apoio e contribuições neste trabalho.

Ao Flavio da Silveira Bitencourt pela ajuda incondicional, pela amizade, por um olhar de apoio nas horas difíceis, pelos gestos de compreensão e paciência, pela

dedicação e lealdade. Obrigada, por ter tornado agradável a realização deste trabalho. Acredito que não existam palavras para expressar a minha gratidão a você.

As famílias dos amigos Flávio da Silveira Bitencourt e Priscila Pinheiro Silvestre, por terem me acolhido em seus lares nos mais distintos momentos e me tornado por muitas vezes membro da família, meu muito obrigado, tenham certeza do meu enorme carinho por vocês.

As minhas amigas e IC's do laboratório Priscila Pinheiro, Cibele Aguiar, Patrícia Bastos, Ingrid Bezerra, sem a contribuição de vocês este trabalho não seria tão gratificante; a todas vocês minha gratidão e respeito. Aos demais IC's do laboratório Cinthia Teixeira, Carla Camila, Rachel Sindeaux, Lyara Freitas, Robson Ferreira pela valiosa contribuição nos experimentos, foi muito bom trabalhar na companhia de vocês. À Patrícia Samara, técnica do laboratório de Bioquímica da Farmacologia, meu muito obrigado por sua contribuição para este trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Ingrid Figueiredo, Ítalo Cavalcante, Cesar Osório, pela presença de espírito que contribuíram durante esta jornada.

Aos integrantes do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, principalmente aqueles responsáveis pelo trabalho árduo de isolar e purificar as lectinas, em especial ao Cícero Teixeira, Henrique Saviano e Tales Moura que isolaram a lectina.

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

Aos integrantes do Laboratório de Inflamação e Dor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP: Adriana Sousa, Andressa Freitas, Ana Tereza, Dani Carlos, Daniela Secco-Abud, Daniele Nascimento, Danilo Magro, Eleonora Uchoa, Fabiane Sonogo, Fabrício Mineiro, Fernanda Castanheira, Fernando Spiller, Guilherme Rabelo, Jhimmy Talbot, Larissa Garcia, Maria do Carmo, Paula Gizele, Paulo Barboni, Renata Grespan, Rafael Poloni, Silvia Trevelin, Silvio Manfredo, Thiago Garlet, Vanessa Carregaro, Victor Lugari, e aos demais estudantes, meus sinceros agradecimentos, saibam que tenho imenso carinho por vocês.

As técnicas integrantes do Laboratório de Inflamação e Dor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP: Diva Amábile, Fabíola Mestriner, Giuliana Bertozzi,

Kátia Santos, Ieda Regina Santos e Sergio Rosa pela inestimável contribuição durante minha estada, o profissionalismo de vocês engrandece este departamento.

À coordenadora do curso de Pós-Graduação em Bioquímica - UFC, Professora Norma Maria Benevides pela colaboração ao longo do curso.

Aos Professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica - UFC, pelos seus ensinamentos ao longo das disciplinas, em especial ao secretário Marcio Sousa que sempre me socorreu nos meus questionamentos.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pelos nossos momentos de intenso estudo em que vocês compartilharam seus conhecimentos, em especial à Neuza Félix, pela amizade, ajuda incondicional, companheirismo, desabafos e incentivo.

À professora Dirce Fernandes e seus estudantes por terem me acolhido como agregada em seu laboratório, obrigado pelos momentos de descontração vividos.

A minha mãe Santa Figueiredo pela sua incansável busca pelo meu sucesso, tenho certeza que meu sucesso futuro será fruto de seu investimento no passado e apoio no presente; ao meu pai João Sidenei Figueiredo (*in memoriam*) que embora ausente possui sua contribuição em minha formação.

Ao Roni de Azevedo obrigado pelo apoio em todas as minhas escolhas, pela compreensão nas alterações de humor durante os períodos difíceis, sei que algumas vezes fui “deselegante”, agradeço pelo incentivo e companheirismo nos momentos do decorrer deste curso; enfim por todo carinho.

Aos professores e amigo Jorge Martins e professora Massako Dourado (UFPel), pelas conversas incentivadoras e os conselhos no decorrer deste trajeto.

Aos amigos: Renato Trevisan, José Marcus Fiss, Patrícia Ferreira, Caroline Addison, Rosenéia Crezel pelo incentivo e torcida.

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

Este Trabalho foi Realizado com o Auxílio das Seguintes Instituições:

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

ÍNDICE

| | | |
|--------------|--|-----------|
| | LISTA DE FIGURAS | |
| | LISTA DE TABELAS | |
| | LISTA DE ABREVIATURAS | |
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 25 |
| 1.1 | LECTINAS: DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO..... | 25 |
| 1.1.2 | Efeitos biológicos de lectinas vegetais..... | 28 |
| 1.1.3 | Lectinas de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> Piper | 30 |
| 1.2 | O PROCESSO INFLAMATÓRIO..... | 30 |
| 1.2.1 | Eventos vasculares e celulares..... | 32 |
| 1.2.2 | Mediadores inflamatórios..... | 35 |
| 1.2.3 | Resposta Imune..... | 40 |
| 1.3 | ASPECTOS DA DOR E NOCICEPÇÃO..... | 41 |
| 1.3.1 | Classificação dos tipos de dor e mecanismos | 42 |
| 1.3.2 | Dor devido a um processo inflamatório..... | 45 |
| 1.4 | JUSTIFICATIVA..... | 47 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 49 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 49 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 49 |
| 2.2.1 | RELACIONADOS A ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA..... | 49 |
| 2.2.2 | RELACIONADOS A ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA..... | 50 |
| 2.2.3 | RELACIONADOS A TOXICIDADE SUBCRÔNICA..... | 50 |
| 3. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 52 |
| 3.1 | LECTINA..... | 52 |
| 3.2 | DROGAS E REAGENTES..... | 52 |
| 3.3 | EQUIPAMENTOS E MATERIAIS..... | 54 |
| 3.4 | ANIMAIS EXPERIMENTAIS..... | 55 |
| 3.5 | ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DE SEMENTES <i>Canavalia boliviana</i> – CboL: EFEITO SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS.... | 56 |

| | | |
|---------|---|-----------|
| 3.5.1 | Avaliação do efeito da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina..... | 56 |
| 3.5.1.1 | Envolvimento do sítio de ligação à D-glicose da lectina de <i>Canavalia boliviana</i> sobre a migração de neutrófilos..... | 56 |
| 3.5.1.2 | Avaliação da atividade antiinflamatória da lectina de <i>Canavalia boliviana</i> após desnaturação térmica..... | 57 |
| 3.5.1.3 | Efeito da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> sobre alterações da permeabilidade vascular na cavidade peritoneal induzida por carragenina | 57 |
| 3.5.1.4 | Efeito da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> sobre rolamento e adesão dos leucócitos induzidos por carragenina na microcirculação mesentérica | 58 |
| 3.5.1.5 | Efeito da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> sobre a concentração de citocinas..... | 59 |
| 3.5.1.6 | Envolvimento do óxido nítrico no efeito antiinflamatório da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> | 60 |
| 3.5.2 | Avaliação da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por ovoalbumina em animais pré-imunizados | 61 |
| 3.5.3 | Avaliação do efeito da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> sobre a quimiotaxia <i>in vitro</i> de neutrófilos..... | 61 |
| 3.6 | ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA LECTINA DE SEMENTES DE <i>Canavalia boliviana</i> – CboL..... | 62 |
| 3.6.1 | Modelo de nocicepção induzida por ácido acético: contorções abdominais..... | 62 |
| 3.6.2 | Modelo de nocicepção induzida por formalina | 63 |
| 3.6.3 | Modelo de nocicepção induzida por aquecimento térmico: Teste da placa quente..... | 63 |
| 3.6.4 | Modelo de hipernocicepção mecânica: Teste de pressão crescente na pata de ratos..... | 64 |
| 3.6.4.1 | Avaliação do efeito da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> hipernocicepção mecânica induzida por carragenina..... | 65 |

| | | |
|---------|---|----|
| a) | Efeito da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> sobre a migração de neutrófilos induzida por carragenina na pata de ratos..... | 65 |
| b) | Efeito da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> sobre a concentração de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10) induzida por carragenina na pata de ratos..... | 66 |
| 3.6.4.2 | Avaliação do efeito da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> sobre a hipernocicepção induzida por prostaglandina..... | 66 |
| 3.6.4.3 | Modelo de hipernocicepção mecânica induzida por ovoalbumina em animais pré-imunizados..... | 67 |
| a) | Efeito da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> sobre migração de neutrófilos induzida por ovoalbumina na pata de ratos..... | 67 |
| 3.6.4.4 | Avaliação da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> sobre o limiar basal dos animais no modelo de hipernocicepção..... | 68 |
| 3.6.5 | Avaliação do efeito da lectina de <i>Canavalia boliviana</i> por diferentes vias de administração no modelo de hipernocicepção mecânica..... | 68 |
| 3.6.5.1 | Avaliação do efeito da lectina de <i>Canavalia boliviana</i> através da administração intratecal no modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina..... | 68 |
| 3.6.5.2 | Efeito de administração intra-cérebro-ventricular da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> em modelo de hipernocicepção induzida por carragenina .. | 68 |
| a) | Efeito da administração intra-cérebro-ventricular da lectina de <i>Canavalia boliviana</i> sobre a migração de neutrófilos nas patas de ratos estimuladas com carragenina..... | 69 |
| b) | Efeito de administração intra-cérebro-ventricular da lectina de sementes de <i>Canavalia boliviana</i> em modelo de hipernocicepção induzida por carragenina... | 70 |
| 3.6.6 | Teste do Rota Rod..... | 70 |
| 3.6.7 | Teste do campo aberto..... | 70 |
| 3.7 | TOXICIDADE SUB-CRÔNICA..... | 71 |
| 3.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 72 |
| 4. | RESULTADOS..... | 74 |
| 4.1 | ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA..... | 74 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 4.1.1 | peritoneal da camundongos induzida por carragenina..... | 74 |
| 4.1.1.1 | Associação da lectina de <i>Canavalia boliviana</i> ao seu açúcar ligante (D-Glicose) reverte seu efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal..... | 74 |
| 4.1.1.2 | Desnaturação térmica da lectina de <i>Canavalia boliviana</i> reverte seu efeito antiinflamatório no modelo de peritonite induzida por carragenina..... | 76 |
| 4.1.1.3 | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> reduz alteração da permeabilidade vascular em peritonite induzida por carragenina..... | 76 |
| 4.1.1.4 | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> diminui o rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério peritoneal de camundongos estimulados com carragenina..... | 76 |
| 4.1.1.5 | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> reduziu as concentrações de TNF- α e IL-1 β e aumentou IL-10 no sangue de camundongos estimulados com carragenina..... | 79 |
| 4.1.1.6 | Tratamento com a lectina <i>Canavalia boliviana</i> não altera concentração de óxido nítrico..... | 79 |
| 4.1.2 | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> reduz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por ovoalbumina em camundongos imunizados... | 82 |
| 4.1.3 | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> inibe quimiotaxia induzida por MIP-2 <i>in vitro</i> | 82 |
| 4.2 | ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA..... | 84 |
| 4.2.1 | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> diminui a freqüência de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos..... | 84 |
| 4.2.2 | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> apresenta atividade antinociceptiva nas fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina..... | 84 |
| 4.2.3 | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> apresenta atividade antinociceptiva central avaliada pelo teste da placa quente..... | 84 |
| 4.2.4 | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> reduz de forma tempo-resposta a hipernocicepção mecânica induzida por carragenina em ratos..... | 87 |
| a) | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> reduz a migração de neutrófilos induzida por carragenina na pata de ratos..... | 88 |

| | | |
|---------|---|-----|
| b) | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> não interfere nas concentrações de IL-1 β , TNF- α e IL-10 nas patas de ratos estimulados com carragenina..... | 91 |
| 4.2.4.1 | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> reduz a hipernocicepção mecânica induzida por prostaglandina e demonstra envolvimento com sistema opióide..... | 91 |
| 4.2.4.2 | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> reduz de forma tempo-resposta a hipernocicepção mecânica induzida por ovoalbumina em ratos imunizados..... | 91 |
| a) | O influxo de neutrófilos induzido pela administração de ovoalbumina em ratos imunizados é reduzido pela lectina de <i>Canavalia boliviana</i> | 96 |
| 4.2.4.3 | Efeito da lectina de <i>Canavalia boliviana</i> sobre o limiar basal dos animais em modelo de hipernocicepção..... | 96 |
| 4.2.5 | Avaliação do efeito da lectina de <i>Canavalia boliviana</i> por diferentes vias de administração no modelo de hipernocicepção mecânica..... | |
| 4.2.5.1 | Administração intratecal da lectina de <i>Canavalia boliviana</i> não reduz hipernocicepção induzida por prostaglandina..... | |
| 4.2.5.2 | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> administrada intra-cerebro-ventricular reduz hipernocicepção induzida por carragenina..... | 96 |
| a) | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> administrada intra-cerebro-ventricular reduz migração de neutrófilos induzida por carragenina..... | 98 |
| b) | Efeito da administração intra-cerebro-ventricular da lectina de <i>Canavalia boliviana</i> sobre o limiar basal nociceptivo dos animais apresenta atividade anti-hipernociceptiva e demonstra envolvimento com sistema opióide..... | 98 |
| 4.2.6 | A coordenação motora de camundongos não é afetada pela administração da lectina de <i>Canavalia boliviana</i> | 101 |
| 4.2.7 | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> não modificou a locomoção espontânea de camundongos no teste de campo aberto..... | 103 |
| 4.3 | EFEITOS DO TRATAMENTO SUBCRÔNICO COM LECTINA DE <i>Canavalia boliviana</i> EM CAMUNDONGOS..... | 103 |
| 5. | DISCUSSÃO..... | 105 |
| 6. | CONCLUSÃO..... | 124 |
| 7. | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 127 |
| 8. | ANEXO..... | 150 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Interação entre leucócitos e a célula endotelial durante alteração vascular..... | 33 |
| Figura 2 – Lectina de CboL inibe a migração de neutrófilos induzida por carragenina para a cavidade peritoneal de camundongos..... | 75 |
| Figura 3 – Associação de CboL ao seu ligante (D-Glicose) reverte seu efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos..... | 75 |
| Figura 4 – Desnaturação térmica de CboL inibe sua atividade antiinflamatória no modelo de peritonite em camundongos..... | 77 |
| Figura 5 – Lectina de CboL reduz a alteração da permeabilidade vascular induzida por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos..... | 77 |
| Figura 6 – Lectina de CboL diminui a rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos..... | 78 |
| Figura 7 – Lectina de CboL reduz as concentrações de IL-1 β e TNF- α e aumenta concentração de IL-10 no sangue em camundongos estimulados com carragenina..... | 80 |
| Figura 8 – Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> não altera concentrações de NO no sangue de camundongos..... | 81 |
| Figura 9 – Lectina de CboL reduz migração de neutrófilos induzida por ovoalbumina em camundongos imunizados..... | 83 |
| Figura 10 – Lectina de CboL inibe quimiotaxia de neutrófilos <i>in vitro</i> | 83 |
| Figura 11 – Lectina de CboL reduz o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos..... | 86 |
| Figura 12 – Lectina de CboL reduz hipernocicepção mecânica induzida por carragenina..... | 89 |
| Figura 13 – Lectina de CboL reduz o influxo de neutrófilos na pata de ratos estimulados com carragenina..... | 90 |

| | |
|---|------------|
| Figura 14 – Lectina de CboL não altera as concentrações de IL-1β, TNF- α e IL-10 na pata de ratos estimulados com carragenina..... | 93 |
| Figura 15 – Lectina de CboL reduz hipernocicepção mecânica induzida por prostaglandina demonstrando possível envolvimento de sistema opióide..... | 94 |
| Figura 16 – Lectina de CboL reduz hipernocicepção mecânica induzida por ovoalbumina..... | 95 |
| Figura 17 – Lectina de CboL reduz o influxo de neutrófilos na pata de ratos imunizados e estimulados com ovoalbumina..... | 97 |
| Figura 18 – Efeito da lectina CboL sobre o limiar basal dos animais no modelo de hipernocicepção..... | 97 |
| Figura 19 – Lectina de CboL administrada por via intratecal não reduz hipernocicepção mecânica induzida por prostaglandina..... | 99 |
| Figura 20 – Lectina de CboL administrada intra-cerebro-ventricular reduz hipernocicepção mecânica induzida por carragenina..... | 99 |
| Figura 21 – Lectina de CboL administrada intra-cerebro-ventricular reduz o influxo de neutrófilos na pata de ratos estimulados com carragenina..... | 101 |
| Figura 22 – Efeito da lectina de CboL administrada intra-cerebro-ventricular sobre o limiar basal e envolvimento do sistema opióide em modelo de hipernocicepção mecânica..... | 102 |
| Figura 23 – A coordenação motora de camundongos não é afetada pela administração da CboL..... | 104 |
| Figura 24 – A locomoção espontânea de camundongos não é afetada com a administração da lectina de CboL | 104 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Principais eventos envolvendo lectinas..... | 27 |
| Tabela 2. Efeito da CboL no teste da formalina em camundongos..... | 87 |
| Tabela 3. Efeito da CboL no teste da placa quente em camundongos..... | 87 |
| Tabela 4. Tratamento subcrônico dos camundongos com CboL..... | 106 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------|--|
| AA = | Ácido Araquidônico |
| ADP = | Adenosina dinucleotídeo fosfato |
| AINEs = | Antiinflamatórios não-estereodais |
| Å = | Angstrom |
| ALT = | Alanina Aminotransferase (enzima) |
| ANOVA = | Análise de Variância |
| ATP = | Adenosina Trifosfato |
| AST = | Aspartato aminotransferase (enzima) |
| BioMoLab | Laboratório de Moléculas biologicamente ativas |
| = | |
| cav = | Cavidade |
| CboL = | Lectina de <i>Canavalia boliviana</i> |
| CFA = | Adjuvante de freund's completo |
| Cg = | Carragenina |
| CGRP = | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina |
| cm = | Centímetro |
| ConA = | Lectina de <i>Concanavalina</i> |
| COX = | Enzima Ciclooxygenase |
| C5a = | Quinto componente do sistema complemento ativado |
| CXC = | Receptor para quimiocina |
| ELISA = | Ensaio imunoabsorbante por enzima ligada "enzyme-linked immunosorbent assay" |
| E.P.M. = | Erro padrão da média |
| eNOS = | Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase |
| e.v. = | Endovenoso |
| FI = | Falso imunizado |
| g = | Gramas |
| GABA = | Ácido gama-aminobutírico |
| Glc-Nac = | N-acetilglicosamina |
| GRDS = | Gânglios da Raiz Dorsal |
| HE = | Hematoxilina Eosina |
| ICAM 1 = | Moléculas de adesão intercelular-1 |

| | |
|----------------------------------|--|
| i.c.v. = | Intra-cerebro-ventricular |
| IFN-α = | Interferon alfa |
| IFN-γ = | Interferon gama |
| IFA = | Adjuvante de freund's incompleto |
| IL-1 = | Interleucina 1 |
| IL-4 = | Interleucina 4 |
| IL-6 = | Interleucina 6 |
| IL-8 = | Interleucina 8 |
| IL-10 = | Interleucina 10 |
| iNOS = | Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase |
| i.p. = | Intraperitoneal |
| i.pl. = | Intapltantar |
| i.t. = | Intratecal |
| i.v. = | Intravascular |
| KDa = | Kilodaltons |
| LPS = | Lipopolissacarideo |
| LTB₄ = | Leucotrieno B₄ |
| M = | Molar |
| mAb = | Anticorpo monoclonal |
| mg = | Miligramas |
| mm = | Milímetros |
| min = | Minuto |
| MIP = | Proteína inflamatória de macrófagos |
| mL = | Mililitros |
| MPO = | Mieloperoxidase |
| nm = | Nanômetros |
| NaCl = | Cloreto de sódio |
| NaPO₄ = | Fosfato de sódio |
| NFKβ = | Fator de transcrição nuclear kappa beta |
| NGF = | Fator de crescimento do nervo |
| NO = | Óxido Nítrico |
| NOS = | Enzima óxido nítrico sintase |
| nNOS = | Isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase |

| | |
|-------------------------------------|--|
| NO₂⁻ = | Nitrito |
| NO₃⁻ = | Nitrato |
| OVA = | Ovalbumina |
| PAF | Fator de agregação plaquetária |
| PBS = | Tampão salina fosfato |
| PG = | Prostagandina |
| PGD₂ = | Prostaglandina D₂ |
| PGE₂ = | Prostaglandina E₂ |
| PGF_{2α} = | Prostaglandina F₂ alfa |
| PGI₂ = | Prostaglandina I₂ (prostaciclina) |
| PKC = | Proteína quinase C |
| s = | Segundos |
| s.c. = | Subcutâneo |
| SNC = | Sistema nervoso central |
| SP = | Substância P |
| TGF-β = | Fator de crescimento transformador beta |
| Th1 = | Células T auxiliaadoras 1 |
| TXA₂ = | Tromboxano A2 |
| TNF-α = | Fator de necrose tumoral alfa |
| UI = | Unidade Internacional |
| VCAM-1 = | Molécula de adesão vascular |
| WGA = | Aglutinina do germe de trigo (do inglês: Wheat Germ Agglutinin) |
| µg = | Micrograma |
| µL = | Microlitro |
| µm = | Micrometro |
| µM = | Micromolar |
| % = | Porcentagem |

RESUMO

POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DA LECTINA DE SEMENTES DE *Canavalia boliviana* PIPER: MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS. JOZI GODOY FIGUEIREDO. Orientador: Benildo Sousa Cavada. Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará.

Lectinas são (glico) proteínas de origem não imune e que podem reconhecer e se ligar reversivelmente a carboidratos ou a outras substâncias derivadas de açúcares. A lectina de sementes de *Canavalia boliviana* Piper (CboL) é uma proteína de aproximadamente ± 100 KDa e especificidade de ligação a D-Glicose. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiinflamatória e antinociceptiva da CboL. Para tal, utilizamos camundongos *Swiss* (25-35g) e ratos *Wistar* (150-220g). No estudo da atividade antiinflamatória, CboL (1, 5 e 10 mg/kg; e.v.; 15 minutos) reduziu a permeabilidade vascular e inibiu a migração de neutrófilos (rolamento e adesão) para a cavidade peritoneal de animais estimulados com carragenina (Cg), e este efeito parece estar relacionado com a redução da concentração de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) e aumento da concentração da citocina antiinflamatória (IL-10). A administração conjunta de CboL com D-Glicose (açúcar ligante) reverteu sua atividade antiinflamatória, sugerindo participação do sítio lectínico nesta atividade; o aquecimento de CboL a 100°C, por 10 minutos, inibiu seu efeito antiinflamatório, indicando a importância de sua estrutura na atividade biológica relatada. A lectina não induziu a produção de óxido nítrico no soro. Ainda em relação à atividade antiinflamatória, CboL foi capaz de inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais imunizados e estimulados com ovoalbumina (OVA), esta mesma lectina foi eficaz em inibir a migração de neutrófilos *in vitro* estimulada por MIP-2, demonstrando então um papel direto da CboL na inibição da migração. No estudo da atividade antinociceptiva, CboL (1, 5 e 10 mg/kg; e.v.; 15 minutos) reduziu as contorções abdominais induzidas por ácido acético e diminuiu a primeira e segunda fase do teste da formalina, demonstrando uma atividade sobre a dor neurogênica e inflamatória. No teste da placa quente, CboL apresentou efeito possivelmente envolvendo receptores opióides confirmado pela modulação com naloxona. Para avaliar a hipernocicepção foi utilizado o estesiômetro mecânico. Assim, CboL (1, 5 e 10 mg/kg; e.v.; 15 minutos) inibiu a hipernocicepção mecânica induzida por administração intraplantar de Cg, prostaglandina E₂ (PGE₂) e OVA (animais imunizados). Este efeito foi correlacionado ao bloqueio do influxo de neutrófilos, sugerido pela redução da atividade da mieloperoxidase nas patas de animais pré-tratados com CboL (5 mg/kg; e.v.; 15 minutos) e estimulados por Cg e OVA. Este efeito anti-hipernociceptivo não parece estar envolvido com a redução local das concentrações de TNF- α e IL-1 β ou aumento de IL-10, uma vez que CboL (5 mg/kg; e.v.; 15 minutos) não reduziu os níveis destes mediadores no tecido da pata de animais estimulados com Cg. CboL também foi hábil em demonstrar efeito sobre o limiar basal nociceptivo no modelo de hipernocicepção. A via intra-cerebro-ventricular CboL (10, 30 e 100 μ g) se mostrou eficiente em inibir a hipernocicepção induzida por Cg confirmando mais uma vez o efeito de receptores opióides através da modulação com naloxona. Em relação a efeitos provocados por uma atividade central, CboL (1, 5 e 10 mg/kg; e.v.) não alterou a atividade motora e locomotora nos animais. A toxicidade subcrônica foi avaliada pelo tratamento de camundongos com CboL (5 mg/kg; e.v.), durante 14 dias consecutivos, através de vários parâmetros: funções do rim (dosagem de uréia) e do fígado (avaliação da cinética da aspartato amino transaminase e alanina amino transaminase), coração, estômago (avaliação de possíveis lesões), massa corporal e leucograma. Os resultados obtidos não mostraram qualquer alteração dos parâmetros avaliados, demonstrando que a CboL não apresenta toxicidade. Portanto, a atividade antiinflamatória e antinociceptiva da CboL está associada com a inibição da migração de neutrófilos, que provavelmente é reflexo da inibição da liberação de TNF- α e IL-1 β e aumento de IL-10 e que há envolvimento de PGE₂ e da via antigênica. O efeito central parece ocorrer via sistema opióide.

Palavras-chave: *Canavalia boliviana*; antiinflamatória; antinociceptiva; receptor opióide, dor.

ABSTRACT

POTENCIAL ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITIES OF LECTIN FROM *Canavalia boliviana* SEEDS PIPER. Jozi Godoy Figueiredo. Supervisor: Dr. Benildo Sousa Cavada. Graduate Biochemistry, Federal University of Ceara.

Lectins are non-immune (glyco)proteins that can recognize and reversibly bind to carbohydrates or other substances derived from sugars. The lectin from seeds of *Canavalia boliviana* Piper (CboL) is a protein of approximately ± 100 KDa with a binding specificity to D-Glucose. The aim of this work was to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive activity of lectin from *Canavalia boliviana* seeds. To this end, we used Swiss mice (25-35g) and Wistar rats (150-220g). In the study of anti-inflammatory activity, CboL (1, 5 and 10 mg / kg, and i.v. 15 minutes) reduced vascular permeability and inhibited the migration of neutrophils (rolling and adhesion) to the peritoneal cavity of animals stimulated with carrageenan (Cg), and this effect seems to be related to the reduction of the concentration of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β) and the concentration of anti-inflammatory cytokine (IL-10). Co-administration of CboL with D-glucose (sugar ligand) reversed its anti-inflammatory activity, suggesting involvement of the lectin site in this activity. CboL heated at 100°C for 10 minutes inhibited the anti-inflammatory effect, indicating the importance of the reported biological structure activity. The lectin did not induce the production of nitric oxide in serum. What is more, in relation to anti-inflammatory activity, CboL was able to inhibit the migration of neutrophils into the peritoneal cavity of immunized animals and when stimulated with ovalbumin (OVA), the same lectin was effective in inhibiting the migration of neutrophils in vitro stimulated by MIP-2, thus demonstrating a direct role of CboL inhibition in migration. In the study of antinociceptive activity, CboL (1, 5 and 10 mg / kg, i.v.; 15 minutes) reduced the writhing induced by acetic acid and decreased the first and second phase of the formalin test, showing activity on pain and neurogenic inflammation. In the hot plate test, CboL had no effect involving opioid receptors, which was confirmed by modulation with naloxone. To assess the hypernociception, esthesiometer mechanic was used. Thus CboL (1, 5 and 10 mg / kg, i.v.; 15 minutes) inhibited the induced mechanical hypernociception intraplantar administration of Cg, prostaglandin E₂ (PGE₂) and OVA (immunized animals). This effect correlated to the blockade of the influx of neutrophils, suggested by the decreased activity of myeloperoxidase in the legs of animals pretreated with CboL (5 mg / kg, and v, 15 minutes) and stimulated by Cg and OVA. This anti-hypernociception did not seem to be involved in the reduction of local concentrations of TNF- α and IL-1 β or increase in IL-10 since CboL (5 mg / kg, i.v.; 15 minutes) did not reduce levels in these mediators in the paw tissue of animals stimulated with Cg. CboL was also able to establish itself in the model hypernociceptive effect. The intra-cerebro-ventricular CboL (10, 30 and 100 μ g) proved effective in inhibiting the hypernociception induced by Cg, confirming once again the effect of opioid receptors by modulation with naloxone. Regarding the effects caused by central activity, CboL (1, 5 and 10 mg / kg) did not alter the locomotor and motor activity in animals. The subchronic toxicity was evaluated by treating mice with CboL (5 mg / kg, i.v.) for 14 consecutive days for several parameters of kidney function (blood urea nitrogen) and liver (evaluation of the kinetics of aspartate transaminase and alanine amino transaminase), heart, stomach (evaluation of possible injuries), body weight and leukogram. The results did not show any change in the parameters evaluated, demonstrating that the CboL did not show any toxicity in animals. Therefore, anti-inflammatory and antinociceptive CboL is associated with inhibition of neutrophil migration, which probably reflects the inhibition of the release of TNF- α and IL-1 β and increased IL-10, and that there is involvement of PGE₂ via antigen. The effect seems to occur via the central opioid system.

Keywords: *Canavalia boliviana*, anti-inflammatory, antinociceptive, opioid receptor, pain.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 LECTINAS: DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Os carboidratos apresentam grande versatilidade de ligação, inclusive com outras moléculas de natureza distinta (lipídios, proteínas, grupos funcionais, como fosfato, sulfato, acetil). Esta capacidade de ligação permitiu estas estruturas originarem uma grande variedade de moléculas, fazendo com que este grupo de biomoléculas desenvolvesse capacidade de codificar diversos processos celulares (SCHIMIDT, 1987). As lectinas são capazes de se ligar e reconhecer a informação contida nestas moléculas, modulando desta forma diversos processos biológicos nas mais diferentes espécies (LAINE, 1994; BREWER *et al.*, 2002).

Recentemente, a definição mais utilizada para lectinas é sugerida por PEUMANS e VAN DAMME (1995), na qual lectinas são (glico) proteínas de origem não imune que possuem no mínimo um domínio não-catalítico e que se ligam reversivelmente e especificamente a um mono ou a um oligossacarídeo. Essa ligação a resíduos de carboidratos pode ser de alta especificidade sem, contudo modificar a estrutura química dos ligantes (GRANJEIRO, 1996).

Outros autores como SHARON e LIS (1972) definiram lectinas, como sendo proteínas aglutinadoras de células com especificidade de reconhecimento por carboidratos. Ainda, GOLDSTEIN e colaboradores (1980) confirmaram esse conceito, e acrescentaram que lectinas são proteínas/glicoproteínas de origem não imune com especificidade de ligação a carboidratos, e capazes de aglutinar células e/ ou precipitar glicoconjugados.

Alguns pesquisadores sugerem que a expressão “de origem não imune” não poderia ser empregada em vista que a provável função destas proteínas nas plantas e nos animais envolvia a defesa imunológica contra antígenos de forma direta ou indireta, entretanto as lectinas não se pareciam estruturalmente a anticorpos, ainda que muitas imunoglobulinas se ligassem a açúcares. A ênfase à origem não imune distingue as lectinas de anticorpos anti-carboidratos que também são capazes de aglutinar células. Além disso, plantas e bactérias possuem a presença de lectinas sem possuírem sistema imune (MOREIRA *et al.*, 1991).

As lectinas são classificadas em quatro grandes grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas, conforme suas características estruturais e suas especificidades por carboidratos (PEUMANS e VAN DAMME, 1998).

As merolectinas são biomoléculas que apresentam apenas um único sítio de ligação a carboidratos, ou seja, um único domínio lectínico. Além disso, essas proteínas apresentam baixo peso molecular e devido a sua natureza monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar células. Entre os representantes dessa classe estão as lectinas de orquídea, específicas para manose (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

As hololectinas são proteínas que possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, estando aptas a aglutinar células ou precipitar conjugados, tendo como representante a maioria das lectinas vegetais que são chamados de “hemaglutininas”.

As 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 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 exemplo deste grupo tem as lectinas de tulipa.

Uma variedade de formas de vida – microrganismos, mamíferos e vegetais – relatam a presença destas proteínas, sendo que aquelas encontradas nos vegetais superiores têm sido as mais estudadas (OTTENSOOSER *et al.*, 1974; GERLACH *et al.*, 2005). Na tabela 1 encontra-se o resumo de eventos importantes envolvendo o estudo das lectinas e suas principais aplicações, de acordo com SHARON e LIS (2003).

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

Tabela 1. Principais eventos envolvendo lectinas. Adaptado de SHARON e LIS (2003). LECTINS. Kluwer Academic Publishers, 1-454.

1.1.2 Efeitos biológicos de lectinas vegetais

Entre as lectinas mais estudadas estão as lectinas de plantas, principalmente as da família Leguminosae, que compreende o grupo com maior número de lectinas, tanto do ponto de vista de caracterização físico-química e biológica como do ponto de vista estrutural (CECCATTO *et al.*, 2002). Lectinas dessa família representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos encontradas principalmente em sementes, e em menor extensão em caule e folhas (SHARON e LIS, 2003). A subtribo Diocleinae (família Leguminosae) compreende 13 principais gêneros, sendo que algumas lectinas têm sido isoladas de plantas que pertencem a alguns destes gêneros: *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* (CAVADA *et al.*, 2001).

Foi descrito que as lectinas possuíam a capacidade de aglutinar eritrócitos, linfócitos, fibroblastos, espermatozóides, fungos, bactérias e células vegetais (GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

Carboidratos, glicoconjugados e lectinas são de fundamental importância para a adesão, colonização e patogênese em diversos processos celulares (bactérias e células cancerígenas). Desta forma, BEUTH e colaboradores (1995) conseguiram inibir a adesão de *Streptococcus pneumoniae* em pulmão de camundongos com a administração de Glc-Nac na traquéia dos mesmos.

SHLYAKHOVENKO e colaboradores (1995) sugeriram que lectinas promovem adesão de células tumorais a tecidos alvos e favorecem metástases. Mostrou-se ainda, que a circulação de células cancerígenas no sangue pode formar êmbolos devido a ações lectínicas (LOTAN e RAZ, 1988). Posteriormente, alguns autores também demonstraram atividade antitumoral (ANDRADE *et al.*, 2004) e indução de apoptose em células tumorais por lectinas vegetais (HOSTANSKA *et al.*, 2003).

Recentemente lectinas de plantas tem sido sugerida como drogas com potenciais antineoplásico na futura terapêutica do câncer (LIU *et al.*, 2010). Destacam-se ainda a vantagem da associação de fármacos quimioterápicos a lectinas ligantes de glicoconjugados presentes na superfície de células tumorais, o que possibilita um direcionamento desses fármacos, bem como a diminuição da dose terapêutica das mesmas (GOLDSTEIN *et al.*, 1980). Estudos mostram que

lectinas administradas oralmente podem reduzir significativamente o crescimento de tumores (PUTZAI *et al.*, 2008) e demonstrou-se promissora a utilização de lectinas para direcionar fármacos a células cancerígenas de bexigas (PLATTNER *et al.*, 2008).

Avanços na endocrinologia também foram relatados pelas lectinas, demonstrado através da fosforilação do receptor para insulina, induzida por lectinas vegetais glicose/manose específicas *in vitro* (CAVADA *et al.*, 2003).

Na atividade imunoestimulante e pró-inflamatória lectinas estão associadas com diversas atividades: mitose em linfócitos humanos e indução de produção de interferon- γ (BARRAL-NETO *et al.*, 1992; MACIEL *et al.*, 2004); liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos (GOMES *et al.*, 1994); migração de leucócitos e formação de edema de pata (ALENCAR *et al.*, 2003, 2004, 2007; ALENCAR *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c; BENTO *et al.*, 1993; COELHO *et al.*, 2006; FREIRE *et al.*, 2003; FIGUEIREDO *et al.*, 2009). A ativação de neutrófilos pela expressão de CXCR₂ (SILVA *et al.*, 2006), produção de óxido nítrico por células peritoneais murinas e por tecido obtido de aortas de ratos isoladas *in vitro* (KLEHA *et al.*, 1991; KESHERWANI e SODHI, 2007; GADELHA *et al.*, 2005; ASSREUY *et al.*, 2009).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que lectinas quando administradas endovenosamente, podem apresentar potente ação antiinflamatória (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999, 2005; MOTA *et al.*, 2006; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006). Lectinas também demonstram habilidade em prevenir lesão urotelial no modelo de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos (ASSREUY *et al.*, 1999). Trabalhos recentes com atividade antiinflamatória demonstraram habilidade destas lectinas em inibir o rolamento e adesão dos leucócitos no endotélio vascular *in vivo* (NAPIMOGA *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2009).

Trabalhos na área de neurofarmacologia apontam que lectinas, dependendo da via de administração, podem demonstrar atividade depressora (VASCONCELOS *et al.*, 2009), bem como atividade antidepressiva em teste de nado forçado (BARAUNA *et al.*, 2006).

1.1.3 Lectinas de sementes de *Canavalia boliviana* Piper

Canavalia boliviana Piper é uma angiosperma dicotiledônea pertencente à família Leguminosae papilionaceae, Tribo Phaseolae, sub-Tribo Diocleinae. A família Leguminosae é a segunda maior família de plantas floríferas, possuindo cerca de 650 gêneros e 12.000 espécies. Esta família é dividida em três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinoideae e Papilionaceae, contendo, respectivamente, cerca de 40, 133 e 377 gêneros respectivamente (EVANS, 2002). O gênero das *Canavalias* constitui-se de aproximadamente 70 a 75 espécies de origem tropical. Estas normalmente têm flores luminosas que são polinizadas por insetos como abelhas. Dentre suas espécies, existem algumas amplamente disseminadas e usadas na agricultura como plantas de cobertura, enquanto outras estão ameaçadas de extinção (ILDIS, 2005).

A espécie *Canavalia boliviana* é encontrada principalmente no Peru e Bolívia, encontrada também na região norte do Brasil e é uma planta trepadeira perene, sendo que ela também se encontra na Bolívia e Peru. Não existem relatos na literatura de nomes populares para esta planta (ILDIS, 2005).

De acordo com MOURA e colaboradores (2009) a lectina utilizada neste estudo apresenta-se como tetrâmero, onde cada monômero tem aproximadamente 25,5 KDa, formando no final uma proteína de 100 KDa, sua estrutura foi resolvida a 1.6 Å apresentando identidade estrutural de cerca de 98% com a ConA e outras lectinas do tipo ConA.

1.2 O PROCESSO INFLAMATÓRIO

Historicamente, as quatro manifestações clínicas da inflamação (rubor, dor, calor e tumor) foram descobertas por Cornelius Celsus no início da era cristã e o grego Virchow adicionou o quinto sinal: a perda da função. A inflamação pode ser caracterizada como um mecanismo complexo iniciado tanto por fatores endógenos (necrose tecidual) bem como fatores exógenos (agentes químicos, físicos, estímulo imunológico como, por exemplo, infecção por microorganismos) (MACKAY *et al.*, 2008).

Entre os objetivos da resposta inflamatória estão: localizar a região atingida; reconhecer o agente desencadeador/estímulo lesivo, para sua posterior destruição e

tentativa de reconstruir o tecido danificado; livrar o organismo das conseqüências desta lesão (NATHAN, 2002). O sistema de defesa do indivíduo contra estímulos lesivos envolvem barreiras físicas e químicas, tais como pele e membranas mucosas, assim como a acidez gástrica ou o fluxo secretório e excretório. Agentes que superem estas barreiras se deparam com os mecanismos de defesa, as respostas imunes, designadas a reconhecer e eliminar materiais estranhos. Dessa maneira, os mecanismos de defesa não apenas resguardam o organismo da infecção, mas também consentem a remoção de restos celulares e de componentes teciduais destruídos (WALZOG e GAEHTGENS, 2000).

Diversos tecidos e células participam deste processo, desde as proteínas plasmáticas, células circundantes (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos e plaquetas), vasos sanguíneos, como também os componentes celulares (mastócitos, fibroblastos, macrófagos e linfócitos) e extracelulares (colágeno e elastina - proteínas estruturais; fibronectina, laminina e outras glicoproteínas de adesão; proteoglicanos, etc.) (FRIEDL e WEIGELIN 2008).

Existem dois tipos de inflamação, tomando como base o critério de tempo de permanência do processo no organismo. A inflamação aguda é um tipo de resposta rápida, de modo que ocorra uma estimulação a síntese de mediadores de defesa e um direcionamento dos mesmos ao local da lesão. Sua duração pode ser de minutos, horas ou mesmo alguns dias. Uma maciça presença de proteínas plasmáticas, configurando o edema, e a migração de leucócitos, principalmente os neutrófilos, são fatores que representam as principais características deste processo (COLLINS, 1999; CONE, 2001). Já a inflamação crônica pode se prolongar por períodos bem mais extensos e está associada com alguns outros processos de alteração histológica como fibrose, proliferação de vasos sanguíneos, mas também com a participação de linfócitos e macrófagos, principalmente (KASAMA *et al.*, 2005).

Durante o processo inflamatório características apresentadas tanto na fase aguda como na fase crônica podem ser divididas em eventos vasculares e celulares.

1.2.1 Eventos vasculares e celulares

Mudanças vasculares são reguladas por fatores que controlam a exsudação, as quais ocorrem principalmente nas vênulas pós-capilares durante as primeiras horas do processo inflamatório. Esta fase ocorre ou concomitantemente é desenvolvida em associação entre neutrófilos e o endotélio nas vênulas pós-capilares, a qual contribui para uma fase mais prolongada de aumento da permeabilidade vascular. O exsudato é absorvido para dentro dos vasos linfáticos, aonde deslocam-se para os nódulos linfáticos ou tecido linfático onde uma reação imune pode então ser iniciada (CIRINO *et al.*, 2003).

Inicialmente, ocorre uma vasoconstrição transitória seguida de vasodilatação, que é responsável pelo aumento do fluxo sanguíneo, o que provoca calor e eritema. Posteriormente, ocorre a estase sanguínea advinda do aumento de permeabilidade da microvasculatura, uma vez que o extravasamento de líquidos e proteínas para o interstício provoca hemoconcentração, aumentando a viscosidade sanguínea e gerando o alentecimento da circulação. Dentre os mediadores relacionados ao aumento da permeabilidade vascular citam-se: histamina, serotonina, leucotrienos, complemento C5a, prostaglandinas e substâncias liberadas localmente nas terminações nervosas (taquicinas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - (CGRP) (HEDQVIST, *et al.*, 2000; LECCI *et al.*, 2000).

Após esta fase inicial da resposta inflamatória, ocorre outra etapa caracterizada por migração de leucócitos, processo no qual as células são atraídas para o tecido lesado, denominando-se de quimiotaxia. Este evento é decorrente da liberação de fatores quimiotáticos, como por exemplo, proteínas do sistema complemento e as cininas, que são gerados na corrente sanguínea e encontrados também no sítio da lesão (ALI *et al.*, 1997; FRANGOIANNIS *et al.*, 2001).

Várias células estão envolvidas nesta fase da resposta inflamatória, dentre elas as fagocíticas que são constituídas principalmente de neutrófilos, que fagocitam o agente invasor ou liberam enzimas lisossomais na tentativa de destruir o agente estranho. Caso a inflamação persista, ocorre também, na área lesada, uma infiltração de células do tipo mononucleares, incluindo-se macrófagos e monócitos. (MACKAY, 2008).

As respostas celulares e vasculares que ocorrem na inflamação são direcionadas e amplificadas por substâncias multifuncionais, dentre elas citam-se: citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, mediadores lipídicos e seus

derivados, que promovem o recrutamento e a ativação de células como, por exemplo, polimorfonucleares, mononucleares, células epiteliais, endoteliais, fibroblastos, dentre outros (PELAIA *et al.*, 2003). Dentre os mediadores químicos destacam-se: aminas vasoativas (histamina e serotonina), cininas, sistema complemento (TURNBERG e BOTTO, 2003), metabólitos do ácido araquidônico (AA), como os produtos da via da ciclooxygenase, incluindo endoperóxidos, prostaglandinas, tromboxanos, produtos da via da lipooxygenase, leucotrienos, ácidos hidroxiperoxi-eicosatetraenóico e hidroxieicosatetraenóico (PARENTE e PERRETTI, 2003), metabólitos do oxigênio, óxido nítrico (NO) (FOLKERTS *et al.*, 2001), entre outras.

Os leucócitos oriundos do sangue passam para o tecido inflamado através de um processo que se apresenta em cinco eventos: marginação, rolamento, adesão, diapedese com penetração através da membrana basal dos pericitos (transmigração através do endotélio) e quimiotaxia e/ou haptotaxia (migração no tecido intersticial em resposta ao estímulo quimiotático) (PANES *et al.*, 1999; WALZOG e GAEHTGENS, 2000; NOURSHARGH e MARELLI-BERG, 2005;) (Figura 1).

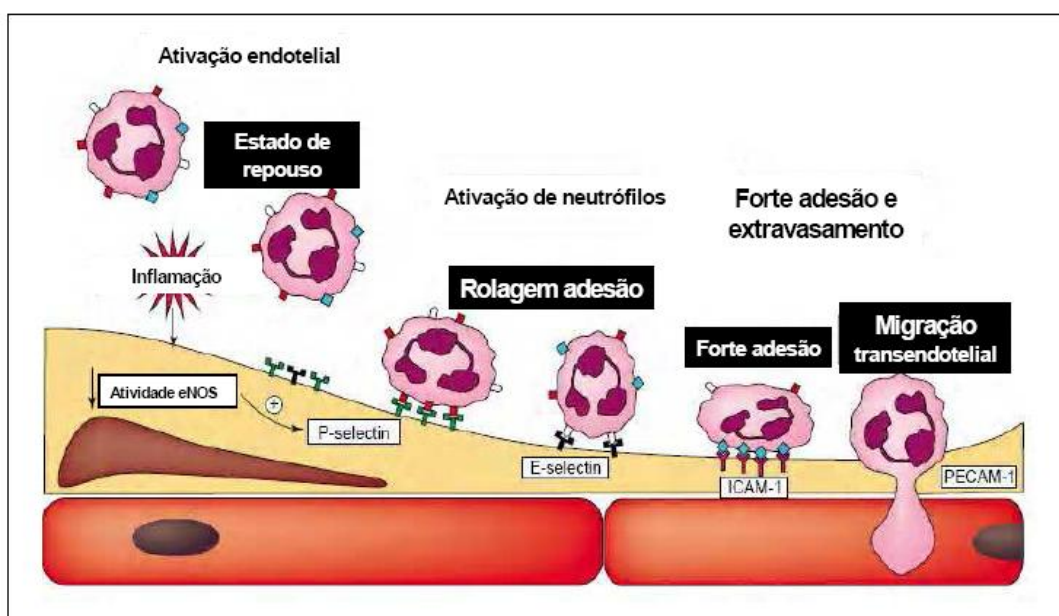


Figura 1. Interação entre leucócitos e a célula endotelial durante alteração vascular. Adaptado por KAKKAR, 2004.

No fluxo sanguíneo normal, leucócitos encontram-se deslocados em direção ao endotélio devido à disposição dos eritrócitos numa coluna axial central (SIMON e

GREEN, 2005). Esse deslocamento, associado a uma redução na velocidade do fluxo sanguíneo pelo aumento da permeabilidade vascular na fase inicial da inflamação, permite que um maior número de leucócitos assumam essa posição periférica, facilitando assim a marginação leucocitária. Posteriormente, leucócitos rolam lentamente sobre o endotélio, aí aderindo transitoriamente (rolamento) e, em seguida, aderem firmemente (adesão). Os leucócitos firmemente aderidos inserem pseudópodos entre as células endoteliais, transpondo as junções interendoteliais e a membrana basal, atingindo o espaço extra vascular e dirigindo-se ao foco inflamatório (SEELY *et al.*, 2003). Além dessa migração através das junções endoteliais, leucócitos podem migrar para a área inflamada através de vacúolos endoteliais, em um processo ativo que ocorre em tecidos especializados como o cérebro e o timo, com crescentes evidências desse processo em outros tecidos.

Após o extravasamento, leucócitos são atraídos para o sítio inflamatório por um processo de quimiotaxia, definido como uma locomoção orientada ao longo de um gradiente químico. Através de quimiorreceptores localizados na membrana plasmática leucocitária, essas células respondem à quimiotaxia, migrando em direção ao local de maior concentração desses agentes quimiotáticos (SEELY *et al.*, 2003).

A adesão e transmigração de leucócitos são produzidas pela ligação entre as moléculas de adesão dos leucócitos e a superfície endotelial. Mediadores químicos-quimiotáticos e certas citocinas medeiam este processo modulando a expressão superficial destas moléculas de aderência. Os receptores de aderência envolvidos pertencem a quatro famílias moleculares: selectinas, imunoglobulinas, integrinas e glicoproteínas semelhantes à mucina. As selectinas são lectinas que interagem com açúcares e/ou glicoproteínas, são responsáveis pela adesão de leucócitos ao endotélio vascular na cascata precoce de eventos que levam aos processos de inflamação. Compreendem a E-selectina que é confinada ao endotélio; a P-selectina presente no endotélio e nas plaquetas; e L-selectina presentes em muitos tipos de leucócitos (KAKKAR, 2004).

As glicoproteínas de membrana molécula de adesão vascular (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) são exemplos de moléculas de adesão que fazem parte da superfamília das imunoglobulinas. VCAM-1 é expressa em células endoteliais ativadas por citocinas, como Fator de Necrose Tumoral-alfa

(TNF- α), por exemplo, enquanto ICAM-1 é expresso por uma variedade de células hematopoéticas e não hematopoiéticas, incluindo células T e B, células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. Integrinas constituem o principal grupo de moléculas de adesão, presentes em muitas células, cujo domínio citoplasmático se liga ao citoesqueleto. Elas são proteínas heterodiméricas compostas de duas cadeias polipeptídicas, α e β , ligadas não covalentemente (SIMON e GREEN, 2005).

1.2.2. Mediadores inflamatórios

Os mediadores inflamatórios atuam nos vasos sanguíneos e células inflamatórias modulando os principais eventos relacionados a inflamação: vasodilatação, opsonização, quimiotaxia para células inflamatórias, destruição tecidual e dor, como também febre e mal estar. Os mediadores da inflamação são classificados como de origem plasmática (advindo das cascatas das cininas, coagulação, fibrinólise e complemento) ou tecidual (aminas vasoativas, eicosanóides, enzimas lisossomais, radicais livres derivados do oxigênio, fator ativador de plaquetas, citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e fatores de crescimento). (LANSEN e HENSON, 1993; CONE, 2001).

A histamina e serotonina estão envolvidas na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular no local da inflamação. A liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos é desencadeada por injúria tecidual, complexo antígeno-anticorpo e pelo sistema do complemento sendo um dos principais mediadores da resposta alérgica (YOKOYAMA, 1989). A serotonina (5-hidroxitriptamina) é um mediador vasoativo pré-formado, encontrado nas plaquetas e células enterocromafins (seres humanos e roedores) e nos mastócitos (roedores). Quando as plaquetas se agregam após contato com o colágeno, trombina, adenosina difosfato (ADP) e complexos antígeno-anticorpo, ocorrem a estimulação da liberação de serotonina (COLLINS, 1999; SIMON e GREEN, 2005).

A bradicinina apresenta um potente efeito sobre a permeabilidade vascular, com efeitos semelhantes aos da histamina. É também um importante mediador no que se refere a resposta inflamatória tecidual a estímulos irritantes, porém sua ação é curta devido à rápida degradação enzimática (FARMER e BURCH, 1992).

As prostaglandinas (PG) são metabólitos do ácido araquidônico e são sintetizadas através das enzimas ciclooxigenases (COX1 e COX2) estando relacionadas com os processos de febre, dor e inflamação. A liberação do ácido araquidônico ocorre como consequência da estimulação específica de receptores da superfície celular e da subsequente ativação de fosfolipases do tipo A₂. Vários tipos de células liberam ácido araquidônico (o qual pode ser substrato da ciclooxigenase responsável pela produção de prostanóides incluindo prostaglandinas e tromboxano A₂) em resposta a diferentes estímulos tais como bradicinina, angiotensina II, vasopressina, trombina, colágeno, adrenalina, ADP, peptídios quimiotáticos e histamina (DRAY, 1995; COLLINS, 1999).

A via da ciclooxigenase leva a formação de prostaglandinas que incluem PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ (prostaciclina) e tromboxano (TXA₂), sendo que todos destacam-se por suas importâncias no processo inflamatório. A prostaciclina é um vasodilatador, forte inibidor da agregação plaquetária além de potencializar efeitos quimiotáticos. A TXA₂ é um potente agente agregador plaquetário e vasoconstritor (YOSHIKAI, 2001).

Liberadas por células do sistema imune, as citocinas, são mediadores protéicos ou peptídicos que apresentam ação direta sobre os receptores celulares, mas também podem induzir a formação de outras citocinas, constituindo uma cascata de amplificação. As citocinas fazem parte da resposta final de uma célula, determinada por certo número de mensagens diferentes recebidas de modo concomitante, na superfície da célula, elas atuam através de mecanismos autócrinos e parácrinos, na célula-alvo, ligam-se a receptores específicos e de alta afinidade, ativando-os; na maioria dos casos, são supra-regulados na célula quando são estimulados. A maioria das citocinas exerce ação em receptores ligados à quinase, que regulam cascatas de fosforilação afetando assim sua expressão gênica (PHILIP *et al.*, 2004).

As citocinas são classificadas em subgrupos, como: interleucinas, fatores de crescimento, quimiocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia ou ainda podem ser classificadas conforme sua atividade biológica como, por exemplo: pró-inflamatórias (interleucina 1β – IL-1β, interleucina 6 – IL-6, fator de necrose tumoral alfa– TNF-α, Fator de crescimento transformador beta – TGF-β) e antiinflamatórias

(interleucina 1Ra – IL-1Ra, interleucina 4 – IL-4 e interleucina 10 – IL-10) (2001; WONG *et al.*, 2003).

As citocinas pró-inflamatórias participam das reações inflamatórias agudas e crônicas, bem como nos processos de reparo. São liberadas por macrófagos e por muitas outras células, podendo desencadear uma cascata de citocinas secundárias.

As citocinas antiinflamatórias inibem algumas fases da reação inflamatória: inibição da produção de quimiocinas (citocinas quimioatraentes), inibição da resposta das células T auxiliadora 1 (Th1). Esta última inibição é importante para evitar ativação celular inapropriada, característica de certas patologias auto-imunes (BORISH e STEINKE, 2003).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que apresenta papel chave em diversos processos, como a inflamação, imuno-modulação, crescimento, angiogênese e citotoxicidade. Dados da literatura descrevem a participação do TNF- α no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (CANETTI *et al.*, 2001; SAUNDERS *et al.*, 2005). Embora, o TNF- α não seja considerado um fator quimiotático clássico, uma vez que não induz migração de neutrófilos *in vitro*, este promove a síntese e liberação de fatores quimiotáticos, como as quimiocinas, tanto pelas células endoteliais quanto pelas células residentes (FACCIOLI *et al.*, 1990).

A IL-1, conhecida sob várias denominações em mais de quarenta anos, é um importante mediador da inflamação; possui duas formas chamadas de IL-1 α e IL-1 β , com 30% de homologia entre elas, compartilhando os mesmos receptores e ações biológicas. Em baixas concentrações a IL-1 (ambas) age como um mediador local da inflamação, aumentando a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais. Em altas concentrações a IL-1 (ambas) chega ao sistema circulatório e passa a exercer efeitos endócrinos como febre e indução da síntese de proteínas plasmáticas de fase aguda pelo fígado (FACCIOLI *et al.*, 1990). Como o TNF- α , a IL-1 induz a expressão de selectina e ICAM-1 nas células endoteliais e promovem a ativação de integrinas nas células polimorfonucleares (WAGNER, 2000). Além disso, estudos demonstram a participação da IL-1 em patologias com elevada presença de neutrófilos, como na artrite e inflamação pulmonar (DRISCOLL *et al.*, 1995; NIKI *et al.*, 2001).

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

A descoberta da superfamília das quimiocinas acrescentou um novo alvo nas pesquisas sobre os mecanismos envolvidos na migração leucocitária para o foco de agressão celular (OPPENHEIM, 1991). Quimiocinas atuam induzindo quimioatração de diversos tipos celulares (leucócitos, fibroblastos, células neoplásicas, células pluripotentes sanguíneas). Estruturalmente, são peptídeos com peso molecular entre 7 e 15 KDa, contendo cerca de 60 a 80 aminoácidos e, são produzidas por genes distintos presentes localizados nos cromossomos humanos 4 e 17 (ELSNER *et al.*, 1996; PROUDFOOT *et al.*, 2003).

As quimiocinas são divididas em quatro sub-grupos, baseado no número e posição dos resíduos de cisteínas presentes na proteína: CXC ou β -quimiocinas (quando a quimiocina possui os dois primeiros resíduos de cisteínas separados por um aminoácido simples); CC ou α -quimiocinas (quando a quimiocina possui os dois primeiros resíduos de cisteína adjacentes); XC ou γ -quimiocinas (quando a quimiocina perdeu um dos resíduos de cisteína); CX₃C ou δ -quimiocinas (quando a quimiocina possui os dois primeiros resíduos de cisteína separados por três aminoácidos) (MURPHY, 2001; LIOTTA, 2001; KULBE *et al.*, 2004; KAKINUMA e HWANG, 2006).

Dentre as quimiocinas CXC em humanos, a interleucina 8 (IL-8) é considerada como protótipo de quimiotaxia e ativação de neutrófilos. A expressão do gene e a produção de IL-8 são controladas por diversos mediadores potentes no sítio inflamatório. Além de ter sido detectada em humanos, esta quimiocina também foi detectada em outras espécies de animais tais como coelhos e cães, entretanto, não foi encontrada em roedores como ratos e camundongos. Nesses animais, a CINC-1 em ratos e as quimiocinas KC e MIP-2 em camundongos, apresentam acentuada homologia com a seqüência de aminoácidos da IL-8 e dos Genes relacionados a oncogenes humanos. Com relação aos camundongos, trabalhos

demonstram que as quimiocinas KC e MIP-2 apresentam potente atividade quimiotática tanto em modelos experimentais *in vivo* como *in vitro* (FIGARELLA-BRANGER *et al.*, 2003).

O óxido nítrico (NO) é um mediador inflamatório bastante versátil, apresentando efeitos pró e antiinflamatórios. Está implicado em processos fisiológicos e patológicos, tais como: vasodilatação, inflamação aguda e crônica (GHOSH e SALERNO, 2003). O NO é uma molécula formada pela oxidação da L-arginina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MATSUDA, 2003). Foram identificadas três diferentes isoformas de NOS em células de mamíferos (produtos de diferentes genes): NOS endotelial (eNOS ou NOS III) encontrada em células endoteliais, epiteliais e miócitos cardíacos; NOS neuronal (nNOS ou NOS I) encontrada em neurônios, células musculares esqueléticas e neutrófilos (GREENBERG *et al.*, 1998) e a NOS induzida (iNOS ou NOS II), encontrada em macrófagos, hepatócitos e células musculares lisas (TITHERADGE, 1999).

O óxido nítrico tem efeitos disseminados em respostas fisiológicas e inflamatórias. Nas células endoteliais, o NO produzido, difunde-se rapidamente para fora das células de origem para as células musculares lisas subjacentes, provocando relaxamento e, conseqüentemente, vasodilatação (IGNARO *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1988). A vasodilatação que ocorre no processo inflamatório, induzida por diferentes agentes flogísticos (bradicinina, histamina, substância P, serotonina e trombina), é dependente da liberação de óxido nítrico (SICKER *et al.*, 2001; STOWE *et al.*, 2001; KARABUCAK *et al.*, 2005; WOTHERSPOON *et al.*, 2005; YOUSIF, 2005).

A expressão de iNOS é regulada via fator de transcrição nuclear, dentre eles destaca-se o fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB) (ALDERTON *et al.*, 2001). Células como macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos, após estímulo por Lipopolissacarideo (LPS), citocinas (IL-1β, TNFα, IFN-γ, IL-6), entre outros podem induzir a ação desta enzima (CHAN e FISCUS, 2004).

Sabe-se que ao longo do processo inflamatório, diversos mediadores atuam restringindo os efeitos do dano tecidual, no entanto, dependendo da persistência e/ou intensidade deste dano, alguns mediadores podem difundir-se e mediar sinais e sintomas sistêmicos como febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda,

leucocitose, ativação do sistema complemento, aumento da produção de glicocorticóides, alterações metabólicas e das concentrações plasmáticas de metais como cobre, ferro e zinco. (SHERWOOD *et al.*, 2004).

1.2.3 Resposta Imune

No âmbito do início da resposta imunológica o processo inflamatório é fundamental ligando a imunidade inata e adquirida; nesse período observa-se o aumento da produção de células pela medula óssea que leva ao acúmulo e à ativação de fagócitos que contribuem diretamente para a eliminação de patógenos e/ou injúria (NATHAN, 2006). A patogênese das doenças auto-imunes tais como artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, psoríases, doença de Crohn, esclerose múltipla, entre outras envolvem uma resposta inflamatória mediada por células T auxiliaadoras 1 (Th1), incluindo a produção de citocinas e quimiocinas, capazes de amplificar e exacerbar a resposta imune contra órgãos e tecidos específicos (BRANDTZAEG *et al.*, 1997; GERARD e ROLLINS, 2001).

A resposta imune adquirida engloba as fases iniciais de contato com o imunógeno e ativação de linfócitos e a fase efetora que culmina na eliminação antigênica e retorno à homeostasia do sistema imune.

A defesa contra infecções não se deve apenas à ativação de linfócitos B e T antígeno-específicos, mas também à estimulação da resposta imune inata. Os processos imunológicos desencadeados pela imunidade adquirida permitem a troca de classes de imunoglobulinas, maturação de afinidade dos anticorpos e a formação de memória imunológica, fundamental na proteção do organismo contra exposições subsequentes ao mesmo antígeno (FOGED *et al.*, 2002; JONSDOTTIR *et al.*, 2008).

Em modelos experimentais de inflamação, através da imunização do camundongo com antígeno conhecido, como por exemplo, a ovoalbumina (OVA), pode-se desenvolver um modelo de inflamação antígeno-específico na cavidade peritoneal. Dados da literatura sugerem que a migração de neutrófilos induzida pela OVA em animais imunizados é dependente de MIP-1 α /CCL3 seguido da liberação de TNF- α por linfócitos T CD4+ que, em seguida, induz a síntese de LTB4 promovendo o influxo de neutrófilos para o local do estímulo (CANETTI *et al.*, 2001;

RAMOS *et al.*, 2005). Outros grupos de pesquisa também demonstram o papel do TNF- α e do LTB₄ na migração de neutrófilos em diversos modelos de reação inflamatória (BECK e WALLACE, 1997; KUWABARA *et al.*, 2000).

1.3 ASPECTOS DA DOR E NOCICEPÇÃO

Dor é um sintoma clinicamente importante para a detecção e avaliação de doenças, bem como, para induzir um comportamento de precaução e, conseqüentemente, limitar os possíveis danos (MILLAN, 1999; WOOLF, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2004). A dor foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”.

A origem da palavra dor provém do latim *dolere* e significa sofrimento físico ou moral, pena, desgosto, tormento, aflição e tristeza. Vários indivíduos tentaram definir a dor, ela representa uma categoria de fenômenos que compreende uma diversidade de experiências diferentes e únicas, tendo causas diversas e caracterizadas por qualidades distintas, variando alguns critérios dentre eles destacam-se: somatosensoriais, viscerais, afetivos, culturais e cognitivos. Pelo fato de ser a dor uma sensação íntima e pessoal, é impossível conhecer com exatidão a dor do outro. (RAINVILLE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Apesar de ter sido considerado desde a antiguidade uma das grandes preocupações do ser humano, a dor é uma característica cardinal dos mecanismos protetores fisiológicos normais e uma das suas funções é preservar o organismo, evitando o dano tecidual. O sistema nervoso informa sobre a ocorrência ou perigo de injúria, e a sensação de dor contribui para esta função, estando, portanto relacionado as reações de fuga e esquiva (BESSON e DICKENSON, 1997; RIEDEL e NEECK, 2001).

Enquanto que a dor representa uma percepção subjetiva com uma dimensão psicológica, a nocicepção consiste na recepção dos estímulos pelos nociceptores que codificam sinais para fornecer informações ao sistema nervoso central (SNC) da existência da lesão. Portanto, dor seria o termo mais apropriado para o homem,

enquanto que nocicepção seria mais indicado para animais experimentais (JULIUS e BASBAUM, 2001; BASBAUM e JESSELL, 2003).

1.3.1 Classificação dos tipos de dor e mecanismos

A dor pode ser classificada do ponto de vista temporal em dois grandes grupos: dor aguda (curta duração, com patologia identificável) e dor crônica (longa duração, com associação a uma patologia que pode não ser evidente).

Em se tratando da origem da estimulação do processo doloroso podemos classificar a dor como nociceptiva (desencadeada pela estimulação dos nociceptores localizados em várias partes do organismo), neurogênica (dano tecidual neuronal nos sistemas nervoso periférico ou central), neuropática (disfunção de nervos) e psicogênica, que é a mais difícil de trabalhar, já que não se origina de uma fonte somática detectável, sendo possivelmente desencadeada por fatores psicológicos (MILLAN, 1999).

Dor é uma sensação que compreende três mecanismos básicos: Transdução, que é a ativação dos nociceptores por transformação de um agente nódico – mecânico, térmico e químico- em potencial de ação. Transmissão, que é o conjunto de vias que permitem que o impulso nervoso, gerado ao nível de nociceptor, seja conduzido ao SNC, e modulação, vias responsáveis pela supressão da dor ativadas pelas próprias vias nociceptivas (PORTO *et al.*, 2004).

Os nociceptores, envolvidos nos mecanismos de transdução da dor, são distinguidos por seu relativo alto limiar de ativação, ou seja, eles podem ser ativados por intensos impulsos que são danosos ou potencialmente danosos aos tecidos, mas não com estímulos inócuos como o toque (DJOUHRI e LANSON, 2004). Além dos receptores de alto limiar, destacam-se os receptores de baixo limiar por estímulos naturais, principalmente mecânicos.

Sugerem-se ainda os chamados nociceptores silenciosos (“silent” ou “sleeping”), que são uma pequena proporção das fibras aferentes, os quais normalmente não são responsivos a estímulos. Entretanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios, ou após a administração de agentes flogísticos,

apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais (JULIUS e BASBAUM, 2001).

A sensibilização dos nociceptores ocorrida, por exemplo, em casos de mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), hipóxia ou lesão tecidual seguida de inflamação (estímulo nocivo químico), resulta na liberação local de mediadores químicos (JULIUS e BASBAUM, 2001; GRIFFIS *et al.*, 2006).

A transmissão da dor está associada à atividade elétrica nas fibras nervosas aferentes primárias, que possuem terminações livres no tecido periférico (pele, músculos, articulações, vísceras, conjuntivo dentre outros) (RANG *et al.*, 1991; JULIUS e BASBAUM, 2001). As fibras nociceptivas aferentes são neurônios tipicamente pseudounipolares, com terminações periféricas e centrais. Neurotransmissores que são produzidos dentro do corpo celular (por exemplo, no gânglio da raiz dorsal) são liberados por terminações das fibras nervosas tanto periféricas quanto centrais. Dessa forma, estes neurotransmissores participam na produção do sinal doloroso periféricamente, bem como na promoção de eventos que levam as percepções centrais (SCHMELZ e PETERSEN, 2001).

As fibras A δ são pouco mielinizadas e podem ser divididas em duas classes principais, onde se diferenciam pela temperatura de ativação. As fibras A δ do tipo I são ativadas por temperaturas inferiores à 53 °C, enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas inferiores à 43 °C. A condução da informação nociceptiva que ocorre via fibras A δ é transmitida numa velocidade entre 12 e 30 m/s (MILLAN 1999; JULIUS e BASBAUM 2001). As fibras C, também conhecidas como fibras polimodais, por transmitirem estímulos mecânicos, térmicos e químicos, conduzem a uma velocidade muito mais lenta em relação às outras fibras nociceptivas, em torno de 0,5 a 2 m/s em virtude de não possuírem bainha de mielina (PLEUVRY e LAURETTI, 1996; MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001). Elas correspondem a 80 % das fibras condutoras da informação nociceptiva. Também existem diferenças quanto ao tipo de estímulo nociceptivo capaz de ativar essas fibras. Estas fibras aferentes fazem sinapse em um neurônio de segunda ordem na camada superficial da medula espinhal. O neurônio de segunda ordem cruza a medula espinhal até o lado contralateral e ascende pelo trato espinotalâmico até alcançar o tálamo. No tálamo neurônios de terceira ordem são ativados, levando a informação do estímulo

doloroso até o córtex somatossensorial, onde ocorre a percepção da dor (VANDERAH, 2007).

O terceiro aspecto do processamento do estímulo nocivo é a modulação. Este evento se caracteriza por representar alterações que ocorrem no sistema nervoso em resposta a estímulos nocivos e permitem que sinais nocivos recebidos no corno dorsal da medula espinhal sejam seletivamente inibidos; desta forma modificando a transmissão do sinal para centros superiores. O sistema de modulação endógeno da dor consiste de inter-neurônios bem definidos dentro das camadas superficiais da medula espinhal e tratos neuronais descendentes, que podem inibir a transmissão do sinal de dor (YAKSH, 2006). Além disso, existem várias evidências de que estruturas no tronco cerebral enviam projeções neuronais até a medula espinhal, as quais, pela liberação de diferentes neurotransmissores (serotonina, noradrenalina etc.), são capazes de modular tanto positivamente quanto negativamente a passagem do estímulo nociceptivo. Esses fenômenos são denominados controle descendente facilitatório e inibitório da dor, respectivamente (MILLAN, 2002).

A dor pode ser controlada por mecanismos centrais, uma vez que o sistema nervoso possui circuitos modulatórios que modificam a percepção da dor. O local principal desta modulação é a medula espinhal, onde a interconexão entre vias nociceptivas e não-nociceptivas podem controlar a transmissão da informação nociceptiva para os centros supra-espinhais (BASBAUM e JESSELL, 2003).

Estruturas encefálicas também participam da analgesia, uma vez que a estimulação de regiões como a substância cinzenta periaquedutal produz analgesia profunda e seletiva sem comprometer outras formas de sensibilidade. A substância cinzenta periaquedutal recebe aferências de diversas regiões (hipotálamo, córtex frontal e insular, amígdala, núcleo cuneiforme, *locus ceruleus*, tálamo, formação reticular e corno dorsal da medula espinhal), e ao ser estimulada ativa seus neurônios (ricos em encefalina, substância P e GABA-ácido γ -aminobutírico) que se projetam para o bulbo ventromedial dorsal (núcleo magno da rafe e formação reticular) onde neurônios descendentes ricos em serotonina e encefalinas inibem a transmissão nociceptiva (BEHBEHANI e FIELDS, 1979; URBAN e SHIMIT, 1994; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004).

1.3.2 Dor devido a um processo inflamatório

Neurônios que transmitem a nocicepção após alterações plasmáticas provocam modificações nas sensações dolorosas (MILLAN, 1999). Neste sentido, dois fenômenos da dor inflamatória são reconhecidos clinicamente, a hiperalgesia e alodinia. A definição de hiperalgesia por HARDY e colaboradores (1950) como um estado de intensificação da sensação dolorosa, mediante uma estimulação nociva, enquanto alodinia é definida pela IASP como a dor decorrente de um estímulo normalmente não doloroso. Quando empregados na clínica esses termos têm grande valia, e têm sido utilizados em modelos experimentais (LOESER e MELZACK, 1999). Porém, o uso destes termos em experimentação animal é controverso, pois não é fácil discriminá-los por respostas comportamentais. Em função disto, utilizaremos o termo hipernocicepção inflamatória, ou simplesmente hipernocicepção, para definir a diminuição do limiar de resposta nociceptiva do animal decorrente da sensibilização dos nociceptores, abrangendo hiperalgesia e alodinia.

Na vigência de um processo inflamatório, mediadores químicos liberados devido à injúria tissular ou da ativação do sistema imunológico são os responsáveis pela sensibilização dos nociceptores (FERREIRA, 1972; KANDEL *et al.*, 2000).

A sensibilização dos nociceptores em um quadro inflamatório depende de dois componentes: o simpático e o prostaglandínico, uma vez que a associação de bloqueadores adrenérgicos com inibidores da síntese de prostaglandinas abole a hipernocicepção inflamatória em ratos. Após injúria ou inflamação ocorre a liberação de mediadores químicos originados de diferentes células, esses mediadores podem atuar ativando diretamente os nociceptores ou mesmo sensibilizando-os (KANDEL *et al.*, 2000). A sensibilização dos nociceptores é caracterizada eletrofisiologicamente pela diminuição do limiar de excitabilidade necessário para ativar o nociceptor, pelo aumento da atividade espontânea da célula nervosa e pelo aumento na freqüência de disparo em resposta a estímulos supralimiais (BASBAUM e JESSELL, 2003).

Os mediadores inflamatórios liberados durante a resposta inflamatória podem ser divididos em dois grupos: mediadores intermediários e os finais. Os primeiros são liberados no início e durante a inflamação, sendo responsáveis pela liberação de outros mediadores. Já os mediadores finais interagem diretamente com seus

receptores específicos, presentes nos neurônios aferentes primários, provocando sua sensibilização (CUNHA *et al.*, 2007).

Dentre os mediadores finais podem-se destacar as prostaglandinas, como substâncias que sensibilizam diretamente os nociceptores, desencadeando a hipernocicepção. A formação de prostaglandina pela COX é um dos responsáveis pela sensação de dor (MASFERRER *et al.*, 1994). Além das prostaglandinas, diversos estudos experimentais também demonstram a existência de um componente simpático na sensibilização dos nociceptores durante um processo inflamatório. Substâncias como as aminas simpáticas, são capazes de induzir hipernocicepção mecânica de forma semelhante às prostaglandinas. Além disso, inibidores da liberação das aminas simpáticas e antagonistas de receptores adrenérgicos reduzem parcialmente a hipernocicepção inflamatória mecânica (NAKAMURA e FERREIRA, 1987; SAFIEH-GARABEDIAN *et al.*, 2002, PARADA *et al.*, 2003).

Além deste metabólito do ácido araquidônico, outros mediadores inflamatórios como a serotonina, histamina, cininas, citocinas, neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios, prótons, neurotrofinas, adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico, opióides, entre outros (JULIUS e BASBAUM, 2001; MacMAHON *et al.*, 2005) oriundos do sangue, ou de células do tecido lesado, células adjacentes ou de células inflamatórias contribuem para a transmissão da nocicepção, bem como, para a inflamação e processo de recuperação.

As citocinas são os mediadores que possuem papel mais bem caracterizado na dor inflamatória (VERRI *et al.*, 2006). Estes mediadores que, a princípio, pareciam ser importantes apenas no recrutamento de leucócitos (neutrófilos) para o foco inflamatório, mostraram-se relevantes também na gênese da dor. Dentre as citocinas mais estudadas na hipernocicepção inflamatória destacam-se o TNF- α , a IL-1 β e a IL-8. Foi demonstrado, tanto em ratos, quanto em camundongos, que estas citocinas são liberadas seqüencialmente durante o processo inflamatório e constituem uma ligação entre o estímulo inflamatório e a liberação dos mediadores finais da hipernocicepção (VERRI *et al.*, 2006).

Neste contexto, substâncias capazes de diminuir a condição inflamatória podem ser empregadas no tratamento contra a dor, com o intuito de inibir a produção de mediadores inflamatórios, ou ainda, no bloqueio das atividades das

fibras aferentes, como os bloqueadores dos canais iônicos. Na verdade, a grande maioria dos fármacos presentes no mercado que são utilizados para o controle da dor, possuem um cunho antiinflamatório (MENDELL e SAHENK, 2003). As drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINES) constituem um bom exemplo do inacabado cenário da busca pelo analgésico ideal. As drogas inibidoras da COX-2, de cunho mais específica, ainda não tem mostrado efeitos satisfatórios devido aos seus efeitos colaterais, como ação citotóxica direta, além do risco potencial de problemas cardiovasculares (MUCKHERJEE, 2002; TOMISATO *et al.*, 2004). Mais recentemente, tem-se investigado a utilização clínica de DAINES combinados com opióides (MIRANDA *et al.*, 2005) ou óxido nítrico (MILLER e MEGSON, 2007). Além disso, as descobertas sobre a COX-3 abrem uma nova perspectiva de explicação dos mecanismos centrais de inibidores da dor e febre (CHANDRASEKHRAN, 2002).

1.4. JUSTIFICATIVA

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

O estudo das lectinas vegetais vem demonstrando crescente interesse por diversos pesquisadores, uma vez que as sementes destes vegetais possuem altas concentrações protéicas (propiciando, geralmente, um bom rendimento) e estas moléculas apresentam uma certa facilidade de isolamento. Dessa forma, este estudo pode sugerir uma aplicabilidade biotecnológica para a lectina de sementes de *Canavalia boliviana* Piper na construção de medicamentos alternativos para condições fisiológicas e patológicas relacionadas a dor e a inflamação.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial antiinflamatório e antinociceptivo, da lectina obtida de sementes de *Canavalia boliviana* (CboL), em modelos experimentais de inflamação e nocicepção.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 RELACIONADOS À ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

- Avaliar a atividade da CboL sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por estímulo inflamatório inespecífico (carragenina) e antigênico (ovoalbumina em animais imunizados);
- Investigar o envolvimento do domínio lectínico no possível efeito da CboL, bem como a importância da estrutura tridimensional da lectina na resposta antiinflamatória;
- Investigar o efeito da CboL sobre alterações na permeabilidade vascular para a cavidade peritoneal induzida por estímulo inflamatório inespecífico.
- Investigar o efeito da CboL sobre o rolamento e adesão dos leucócitos no endotélio vascular por microscopia intravital;
- Verificar o efeito da CboL na concentração de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10);
- Estudar a participação do óxido nítrico na possível atividade antiinflamatória da CboL;
- Verificar o possível efeito da CboL sobre quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.

2.2.2 RELACIONADOS À ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

- Avaliar a possível atividade antinociceptiva da CboL em modelos experimentais de estímulos químicos (ácido acético e formalina) e térmico (placa quente);
- Investigar o efeito da CboL em modelos experimentais de hipernocicepção mecânica (Von Frey) induzida por carragenina e prostaglandina E₂, e por ovoalbumina em animais imunizados;
- Avaliar a possível atividade anti-hipernociceptiva da CboL através de diferentes vias de administração.
- Avaliar o efeito da CboL através da concentração de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-10) na pata dos animais estimulados com carragenina;
- Investigar a ação da CboL na atividade locomotora de camundongos através de modelos de rota rod e campo aberto;

2.2.3 RELACIONADOS À TOXICIDADE SUBCRÔNICA

- Avaliar efeitos sistêmicos do tratamento com a CboL através da avaliação dos seguintes parâmetros: leucograma, massa corpórea, aspecto macroscópicos de órgãos vitais, função renal e função hepática.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LECTINA

Sementes de *Canavalia boliviana* (CboL) coletadas na floresta tropical da Amazônia no estado do Amazonas no Brasil foram plantadas no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará para produção de quantidades suficientes de sementes. Estas sementes foram descascadas e moídas até formar um fino pó fino que chamamos de farinha, apropriado para o processo de extração protéica. As proteínas solúveis foram extraídas a 25 ° C por agitação contínua com NaCl 0,15M por 1 hora, seguida por centrifugação a 10.000 g por 20 minutos a 4 ° C na proporção de 1:10 (m/v). O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de cromatografia por afinidade em matriz de Sephadex G-50 (10 x 50 cm) previamente equilibradas com NaCl 0,15 M, contendo 5 mM de CaCl₂ e 5 mM MnCl₂ a uma vazão de 45 mL/hora. A concentração de proteínas nas frações coletadas foi monitorada por absorvância em comprimentos de onda de 280 nm. A fração não retida foi eluída com solução de equilíbrio contendo 0,1M de D-Glicose. A fração retida, referente a lectina, foi dializada previamente contra ácido acético para retirada da glicose e dializada exaustivamente contra água destilada e liofilizada. O teste da atividade hemaglutinante foi realizado de acordo com o procedimento padrão já descrito na literatura (FARIAS *et al.*, 2004). O grau de pureza foi avaliado por SDS-PAGE. A purificação da proteína foi realizada de acordo com MOURA *et al.*, 2009.

Os procedimentos descritos acima foram realizados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), sob a coordenação do professor Dr. Benildo Sousa Cavada.

3.2 DROGAS E REAGENTES

- Ácido acético (PA - Grupo Química Brasil);
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (Merck);
- Ácido fosfórico (Sigma);
- Ácido sulfúrico (Merck);

- Adjuvante de Freund's completo – CFA (Sigma);
- Adjuvante de Freund's incompleto – IFC (Sigma)
- Albumina sérica bovina (Sigma);
- Álcool iodado;
- Anticorpo biotinilado de interleucina 1 (Dako);
- Anticorpo biotinilado de interleucina 10 (Dako);
- Anticorpo biotinilado TNF- α (Dako);
- Avidina – horseradish peroxidase (Dako A/S, Denmark);
- Azul de Evans (MERCK, Alemanha);
- Azul de Tripán (Merck);
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma);
- 1,2-Fenilenodiamina (Sigma);
- Carragenina (Sigma);
- Cloridrato de Naloxona (Narcan);
- Cloreto de Sódio (Merck);
- Diazepam (Roche);
- Dihidrocloro de 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD) (Sigma);
- Eosina (Reagen);
- Formol (PA – Merck);
- Fosfato de sódio (Cequímica);
- D-Glicose (Cequímica);
- Gradiente de Ficoll Hypaque (Sigma);
- Gradiente de Percoll 65% (Sigma);
- Hematoxilina (Reagen);
- Heparina (ampolas de 5.000 UI/ml; HEPARIN®) (Cristália);
- Hidrato de Cloral (Roche);
- Meio RPMI 1640 (Culitlab);
- N-1-Naftil-etilenodiamino-dihidrocloro 1 % (Sigma);
- MIP-2 (Peptotech)
- Nitrito de Sódio (Merck);
- Ovoalbumina (Sigma);
- Peróxido de Hidrogênio (Merk);

- Kits laboratoriais para dosagem: Uréia, Creatinina, AST, ALT. (LABTEST®);
- Solução Salina – Cloreto de sódio estéril a 0,9% (Pharmace);
- Solução de Hank's – (Sigma);
- Solução de Turk (Ácido acético e violeta de genciana-Isofar)
- Soro de cabra (Peptotec);
- Soro de carneiro (Peptotec);
- Sulfanilamida (Sigma);
- Sulfato de morfina (Cristália-Brasil);
- Prostaglandina (Sigma);
- Tetrametilbenzidina (Sigma);
- Tribromoetanol (Sigma);
- Tween 80 (Merck);

3.3 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

- Agitador para tubos de ensaio mod. TE089 (MARCON);
- Agitador magnético Thermolyne, mod M37510/26;
- Agulhas 29G e 25 G;
- Aparelho para ELISA “enzyme-linked immunosorbent assay” (NEUROPROBE Inc. CABIN JOHN, MD);
- Alicates para deslocamento cervical;
- Balança para pesagem dos animais, modelo ID-1500 (FILIZOLA);
- Balança analítica, digital modelo 260 (MARTE);
- Banho -maria modelo 100 (FANEN);
- Base emborrachada para permanência do animal;
- Bastão de vidro;
- Beckers de 5, 10 e 50 mL;
- Câmara de Neubauer;
- Campo aberto (insight)-Brasil;
- Cânulas de polietileno (PE 50);
- Citocentrífuga mod. 248 (FANEM);
- Espectrofotômetro;

- Estufa de CO₂;
- Geladeira e freezer;
- Instrumental cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, etc.);
- Lâminas e lamínulas;
- Luvas descartáveis;
- Placa para ELISA 96 poços (NEUROPROBE Inc. CABIN JOHN, MD);
- Placa quente (Power lab);
- Rota Rod (insight)-Brasil;
- Seringas de insulina 0,5 cc com agulha 29G ultrafina (13 x 3,3) (BENSON - DIKSON);
- Medidor de pH (pHmetro, MICRONAL);
- Membrana de policarbonato (5µm Milipore Corp., Bedford, MA);
- Microcâmara de 48 poços (NEUROPROBE Inc. CABIN JOHN, MD);
- Micropipetas automáticas (GILSON);
- Microscópio óptico binocular (Olympus);
- Power Lab/8sp, AD Instruments®;
- Tubos plásticos de 15 mL (FALCON);
- Von Frey (PanLab).

3.4 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) machos, pesando entre 18 a 25 gramas e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos pesando entre 180 a 220 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e mantidos no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Todos foram acondicionados em gaiolas apropriadas, sob condições adequadas de luz e temperatura, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. Os experimentos foram realizados de acordo com a comissão de ética em pesquisas com animais da Universidade Federal do Ceará (protocolo número 57/2009). Os experimentos conduzidos na USP- Ribeirão Preto tiveram os animais provenientes do Biotério central da Universidade de São Paulo obedecendo aos padrões exigidos.

3.5 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DE SEMENTES *Canavalia boliviana* – CboL: EFEITO SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

3.5.1 Avaliação do efeito da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina

Camundongos receberam por via intraperitoneal (i.p.) carragenina (Cg; 500 µg/cav.) dissolvida em 0,5 mL de salina estéril. CboL (0,5; 1, 5 e 10 mg/Kg) foi administrada por via endovenosa (e.v.) em 0,1 mL de salina, 15 minutos antes da injeção da Cg. Como controle negativo do experimento foram utilizados camundongos que receberam salina estéril e.v.

A migração de neutrófilos foi avaliada após 4 horas da injeção de Cg. Para tanto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através da lavagem desta injetando-se 3,0 mL de salina contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão foram coletados os fluidos peritoneais.

A contagem total e diferencial dos leucócitos foi realizada conforme metodologia descrita anteriormente por SOUZA E FERREIRA (1985). Neste procedimento, 20 µL do fluido coletado de cada animal foram diluídos em 380 µL do reagente de Turk e posteriormente usados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada através de esfregaços corados em lâminas, para tanto, 50 µL do exsudato foram centrifugados em citocentrífuga a 400 x g, durante 10 min, após este processo os esfregaços foram corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE) e as células contadas através de microscópio óptico sendo os resultados expressos como a média ± erro padrão médio (E.P.M.) do número de células x 10⁶/mL de fluido peritoneal.

3.5.1.1 Envolvimento do sítio de ligação à D-glicose da lectina de *Canavalia boliviana* sobre a migração de neutrófilos

A administração da CboL associada à D-glicose (açúcar ligante), neste modelo teve como objetivo investigar o envolvimento do domínio lectínico nos efeitos da CboL. Para tanto, CboL (5 mg/Kg) sozinha ou em solução de D-glicose (0,5M), foi incubada por 30 minutos à 37 °C e posteriormente administrada e.v. (0,1 mL) 15 min antes da injeção i.p. de Cg (500 µg/cav.). Os controles experimentais receberam os seguintes tratamentos: salina e.v e Cg i.p. (controle positivo), somente salina i.p. (controle negativo) e solução de D-glicose e.v. (0,5M incubada 30 min à 37 °C) e Cg i.p. (controle do ligante). A migração de neutrófilos foi avaliada conforme descrito no item 3.5.1.

3.5.1.2. Avaliação da atividade antiinflamatória da lectina de *Canavalia boliviana* após desnaturação térmica

Para demonstrar a importância da estrutura tridimensional da CboL na atividade antiinflamatória foi realizada sua desnaturação. Para tanto, CboL na dose de 5 mg/Kg foi submetida à fervura (100 °C) durante 10 min. Em seguida esta foi injetada 15 min antes do estímulo (Cg). A migração de neutrófilos foi avaliada conforme o item 3.5.1. e os resultados foram comparados com os obtidos com a lectina não desnaturada.

3.5.1.3 Efeito da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* sobre alterações da permeabilidade vascular na cavidade peritoneal induzida por carragenina

Para a avaliação da permeabilidade vascular, os camundongos receberam CboL na dose de 5 mg/Kg e.v. 15 minutos antes da administração do estímulo Cg (500 µg/cav.). Grupo controle recebeu somente salina i.p. Uma hora antes do sacrifício os animais receberam azul de Evans (50 mg/kg) pelo plexo ocular (THURSTON *et al.*, 2000). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 3 horas após a administração de Cg, em seguida, o fluido presente na cavidade peritoneal foi coletado através da lavagem desta injetando-se 3,0 mL de salina contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão foram coletados cerca de 1,0 mL de fluido peritoneal. Para se quantificar o azul de Evans extravasado para a cavidade

peritoneal, realizou-se por espectrofotometria a leitura das densidades ópticas utilizando-se comprimento de onda de 610 nm. Os dados obtidos em absorbância foram convertidos em µg de azul de Evans, através de regressão linear baseado em uma curva padrão de azul de Evans. Os resultados foram calculados em µg de azul de Evans/mL de fluido peritoneal e expressos como média ± E.M.P.

3.5.1.4 Efeito da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* sobre rolamento e adesão dos leucócitos induzidos por carragenina na microcirculação mesentérica

A avaliação do rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio vascular foi realizada por microscopia intravital através de procedimentos previamente descritos (BAEZ, 1969; FORTES *et al.*, 1991). Camundongos receberam CboL nas doses de 1, 5 e 10 mg/Kg e.v. ou salina, 15 minutos antes do estímulo inflamatório Cg i.p. (500 µg/cav). Posteriormente, os animais foram anestesiados com injeção i.p. de solução salina contendo 250 mg/kg de tribromoetanol. Através de uma incisão lateral cutânea na cavidade abdominal, o mesentério foi exteriorizado para a observação da microcirculação *in situ*. Os animais foram mantidos sobre uma placa aquecida (37 °C), dotada de área transparente, sobre a qual o tecido foi fixado. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução de salina estéril a 37 °C. A placa aquecida foi mantida sobre o *charriot* de um microscópio óptico tri-ocular, ao qual estava acoplado um fototubo, com sistema de lentes ampliadoras superpostas, um monitor de computador e um vídeo que permite a projeção e gravação de imagem com aumento final de 3400 vezes (BAEZ, 1969).

Os vasos selecionados para o estudo foram vênulas pós-capilares com diâmetro variando 10 a 18 µm. Duas horas após o estímulo inflamatório (Cg), foi avaliado o rolamento dos leucócitos e o número destes aderidos ao endotélio durante 5 minutos em uma extensão de 10 µm de vênula foi avaliado após 4 horas. Esta extensão é definida na tela do monitor: 10 µm no tecido correspondem a 3,4 cm na tela (FORTES *et al.*, 1991), portanto os resultados foram expressos em rolamento celular/10 µm/min e células aderidas/10 µm². Foram considerados os leucócitos que permaneceram aderidos ao endotélio vascular por mais de 30 segundos (GRANGER

e KUBES, 1989). Duas determinações numéricas foram feitas por animal, estimando-se o resultado como média de ambos.

3.5.1.5 Efeito da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* sobre a concentração de citocinas

As concentrações das citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10), foram determinadas por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) no sangue dos animais pré-tratados com salina e CboL (5 mg/Kg) e.v. 15 min antes da administração da Cg i.p. (500 μ g/cav). Grupo controle negativo recebeu somente salina i.p. Duas horas após a injeção da Cg o fluido peritoneal foi coletado como descrito no item 3.5.1. e estocado a -70 ° C para posterior dosagem das citocinas.

O ensaio para determinação da concentração de IL-1 β , TNF- α e IL-10 foi realizado baseado em protocolo descrito anteriormente por TAKTAK *et al.*, (1991). Placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 μ L de tampão PBS contendo 2,0 μ g/mL do anticorpo monoclonal (mAb) anti-IL-1 β , anti-TNF- α e anti IL-10. A placa foi incubada durante uma noite a 4 °C. Após esse período, a placa foi lavada de 3 a 5 vezes com PBS contendo 0,1% Tween 20 (PBS-T; 200 μ L/poço), e em seguida foram incubadas com 50 μ L de solução de bloqueio (1 % de albumina bovina) durante 2 horas em temperatura ambiente. A placa foi lavada conforme descrito acima e, em seguida adicionou-se as amostras testes (triplicata), colhidas do fluido peritoneal e do homogeneizado da pata. Concentrações decrescentes das citocinas foram diluídas em tampão salina fosfato (PBS)-Tween, e utilizadas para a confecção de uma curva padrão. A placa foi novamente coberta e mantida durante 12 horas a 4 °C. No terceiro dia, a placa foi lavada por três vezes e posteriormente adicionados os anticorpos biotinizados anti-IL-1 β , anti-TNF- α e anti-IL-10 (1:1000 em solução de lavagem contendo 1 % de soro de cabra).

Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lavada e em seguida adicionou-se 50 μ L de uma solução 1:5000 do conjugado avidina-horseradish peroxidase (DAKO A/S, Denmark) diluída em PBS-T. Após incubação por 30 minutos, a placa foi lavada e incubada com 50 μ L do substrato dihidrocloro

1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD, Sigma) diluído em tampão e adicionado com 0,4 μL de H_2O_2 30 %/mL.

Após o desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida pela adição de 75 μL de solução de H_2SO_4 (1M). A medida da absorbância foi determinada a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL de IL-1 β , TNF- α ou IL-10 com base na curva padrão obtida.

3.5.1.6 Envolvimento do óxido nítrico no efeito antiinflamatório da lectina de sementes de *Canavalia boliviana*

Com o objetivo de investigar se o óxido nítrico estaria envolvido no efeito inibitório da CboL sobre a migração de neutrófilos induzida por Cg, os animais foram tratados e.v. com salina (controle) ou CboL (5 mg/Kg) e 15 min após foi administrado Cg i.p. (500 $\mu\text{g}/\text{cav}$). Quatro horas após a administração da Cg, os animais foram levemente anestesiados com éter, e em seguida amostras de sangue foram coletadas do plexo reto orbital através de capilares de vidro heparinizados. Após separação por centrifugação do sangue (10 min a 600 g), o soro foi utilizado para a determinação indireta de NO, mensurado pelos níveis de nitrato, os quais foram determinados através da conversão de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), pela ação da enzima nitrato-redutase e o nitrito quantificado pela reação de Griess (CHEN *et al.*, 2000). Para o ensaio, 40 μL de soro foram incubados por 12 horas com 40 μL de tampão contendo a enzima nitrato redutase em placas de 96 poços. Uma curva padrão de nitrato de sódio (0,78-200 μM) também foi processada da mesma forma que foi realizada para as amostras. A dosagem de NO_2^- foi realizada pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess. Para tal, foram adicionados 80 μL do reagente de Griess (1 % Sulfanilamida em 1 % H_3PO_4 / 0,1 % de N-1-naftil-etenodiamina dihidroclorato/ 1 % H_3PO_4 / água destilada, 1:1:1:1) em cada poço da placa. Foi determinada a absorbância em leitor de ELISA em 560 nm. A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão realizada com NaNO_2 e expressos em μM de NO_2^- .

3.5.2 Avaliação do efeito da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por ovoalbumina em animais pré-imunizados

Para imunizar os camundongos ovoalbumina (OVA; 100 µg) foi dissolvida em salina e adicionada a um volume idêntico de Adjuvante de Freund's Completo (CFA). CFA foi usado para aumentar a eficiência do procedimento de imunização (FREUND, 1956) por prolongar o tempo de vida do antígeno administrado e por estimular uma efetiva ativação direcionada do sistema imune; isto resulta em alterada proliferação e diferenciação leucocitária (BILLIAU e MATTHYS, 2001). Animais foram administrados s.c. (no dorso em dois sítios diferentes) com a emulsão (OVA dissolvida em salina e adicionada com CFA). Os animais falsos imunizados foram administrados de forma semelhante com a emulsão sem OVA. Posteriormente no 7º (sétimo) e 14º (décimo quarto) dia os animais receberam a emulsão de salina com Adjuvante de Freund's Incompleto.

No 21º (vigésimo primeiro) dia do processo de imunização, os camundongos foram pré-tratados com salina (controle positivo) ou CboL (1, 5 e 10 mg/kg em 0,1 mL) e.v. 15 min antes de receberem OVA (10 µg/cavidade em 0,2 mL de salina). Posteriormente, a migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a administração do estímulo de acordo com o item 3.5.1. Os animais falsos imunizados receberam OVA (10 µg/cavidade em 0,2 mL de salina) i.p. e os camundongos imunizados também foram desafiados com 0,2 mL de salina (controles negativos)

3.5.3 Avaliação do efeito da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* sobre a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos

O modelo de quimiotaxia em câmara de Boyden (BOYDEN, 1962) foi utilizado para avaliar se a CboL interage diretamente com neutrófilos *in vitro*. Inibindo a migração. Para tanto, sangue dos camundongos foi coletado por punção cardíaca sob prévia anestesia e colocado em tubos estéreis de 5mL contendo EDTA a 2% e mantidos no gelo. Os polimorfonucleares foram separados das demais células sanguíneas através da metodologia de gradiente de Percoll. Após o isolamento, os PMN foram lavadas com solução de Hanks' por 2 vezes, os sobrenadantes foram

desprezados e as células ressuspensas em meio RPMI. A contagem total das células foi realizada em câmara de Neubauer, e a pureza dos neutrófilos avaliadas em lâminas pela coloração com Panótico e a viabilidade observada por exclusão em azul de tripan.

Finalmente, 1×10^6 neutrófilos/mL foram ressuspensos em meio RPMI/BSA (0,01 %) e pré-incubados por 1 hora (37 °C/CO₂ 2 %) na presença ou não CboL (30, 100 e 300 µg/poço). Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e os neutrófilos lavados 2 vezes com solução de Hanks' e ressuspensos em 1 mL com RPMI/BSA (0,01 %). O ensaio de quimiotaxia *in vitro* foi realizado em Câmara de Boyden utilizando como estímulo MIP-2 (20 ng/mL), que foi colocada em volume de 28,6 µL/poço no compartimento inferior da câmara. A suspensão de células (10^6 células/mL), previamente tratados com a lectina foi colocada (50 µL/poço) no compartimento superior. Os dois compartimentos foram separados por uma membrana de policarbonato (5 µm). A câmara foi incubada (37 °C/CO₂ 2 %) por 1 hora. No final do período de incubação, o filtro foi removido fixado e corado com HEMA. Os neutrófilos que migraram foram quantificados por microscopia óptica usando-se objetiva de imersão (aumento de 100 X).

A contagem foi feita em cinco campos aleatórios, para cada poço de um total de 5 poços, por grupo experimental. Em cada experimento RPMI foi utilizado como controle negativo (migração randômica) e MIP-2 como controle positivo. A migração foi expressa como o número de neutrófilos por campo.

3.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA LECTINA DE SEMENTES DE *Canavalia boliviana* – CboL

3.6.1 Modelo de nocicepção induzida por ácido acético: contorções abdominais

Camundongos em jejum de sólidos receberam CboL e.v. nas doses de 0,5; 1, 5 e 10 mg/Kg diluídas em salina. Grupos controles receberam salina e.v. (controle positivo) ou sulfato de morfina (5 mg/kg; s.c.; controle negativo). Após 15 min dos

tratamentos citados, os animais receberam por via i.p. solução de ácido acético 0,6% (10 mL/kg) e após 10 minutos o número total de contorções abdominais foi determinado por um período de 20 minutos (KOSTER *et al.*, 1959). Os resultados foram expressos como as médias do número de contorções \pm E.P.M.

3.6.2 Modelo de nociceção induzida por formalina

Formalina 1,2 % foi administrada na pata traseira direita de camundongos (20 μ L/pata), previamente mantidos em jejum de sólidos por 12 horas. Imediatamente após a administração da formalina, o tempo no qual o animal passou lambendo a pata estimulada com formalina (“*licking time*”) foi registrado por 5 min (fase 1, neurogênica) e de 20 à 25 min (fase 2, inflamatória) (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

Animais receberam 15 minutos antes da administração da formalina: salina e.v. (controle positivo), sulfato de morfina (5 mg/Kg; s.c.) e CboL nas doses de 1, 5 e 10 mg/Kg (e.v.) diluídas em salina. Os resultados foram expressos como o tempo de lambedura da pata em segundos \pm E.P.M.

3.6.3 Modelo de nociceção induzida por aquecimento térmico: Teste da placa quente

O método da placa quente consiste em colocar camundongos sobre uma placa aquecida (51 ± 0.5 °C) e observar quanto tempo os animais levam para manifestar uma resposta, que corresponde ao ato de saltar e/ou lamber a pata traseira. Sendo este um teste específico de nociceção de resposta central.

Os animais que apresentaram reações ao estímulo térmico, em um intervalo de tempo de até 20 segundos foram selecionados para o teste. Nesse modelo, camundongos receberam salina e.v. (controle positivo), sulfato de morfina (5 mg/Kg; s.c.; droga padrão), CboL nas doses de 1, 5 e 10 mg/Kg (e.v.) no tempo zero (T0) respectivamente. Após 15 min, o tempo de resposta foi avaliado nos tempos de 30(T30), 60(T60), 90(T90), 120(T120), 150(T150) min, com um tempo de corte (“*cut-off*”) de 45 segundos para evitar lesão na pata do animal.

No sentido de investigar um possível envolvimento da CboL com sistema opióide, os animais foram pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, s.c.) um agonista dos receptores opióides, 15 min antes da CboL (5 mg/kg) ou morfina. Após 15 min, o tempo de resposta foi avaliado como descrito acima. Os resultados foram expressos como o tempo de reação em segundos \pm E.P.M (EDDY e LEIMBACH, 1953).

3.6.4 Modelo de hipernocicepção mecânica: Teste de pressão crescente na pata de ratos

O teste de filamentos de Von Frey (VON FREY 1896) é um método utilizado até os dias atuais para avaliar a hipernocicepção mecânica. Essa técnica foi transformada em um método eletrônico usado primeiramente em humanos (JENSEN *et al.*, 1986) e depois em ratos (MOLLER *et al.*, 1998), utilizando de um estesiômetro eletrônico composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas. Ao transdutor foi adaptada uma ponteira com área 0.07 mm², a qual estimula diretamente a pata do animal. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, medindo 12x10x17 cm cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. O experimentador é treinado a aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da pata traseira do animal com uma pressão gradualmente crescente, o qual provoca uma resposta de flexão característica com retirada da pata (comportamento nociceptivo). A resposta é semelhante ao “flinche” que é observada após administração de formalina (DUBUISSON e DENNIS, 1977), agente que causa nocicepção manifesta. O estímulo é interrompido após a observação da resposta característica, descrita acima. Foram realizadas duas medidas distintas para cada animal, sendo calculada a media aritmética das medidas.

A intensidade de hipernocicepção é quantificada como a variação na pressão (Δ limiar de estímulo em gramas) obtida subtraindo-se o valor observado antes do procedimento experimental (0 hora) do valor de reação após a administração dos estímulos que variam de acordo com o experimento.

3.6.4.1 Avaliação do efeito da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* na hipernocicepção mecânica induzida por carragenina

A hipernocicepção mecânica foi mensurada nos tempos 0 e 3 horas após a administração intraplantar (i.pl.) de Cg (100µg/0,1 mL) em ratos pré-tratados e.v. com CboL (0,5; 1, 5 e 10 mg/kg) ou salina (controle positivo) 15 min antes da administração do agente flogístico. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada conforme descrito no item 3.6.4.

Para determinar o curso temporal do efeito da CboL sobre a hipernocicepção induzida por Cg, CboL (5 mg/kg) foi administrada 15 minutos antes de Cg i.pl. sendo a hipernocicepção mecânica avaliada nos tempos: 1, 3, 5, 7, 12 e 24 horas após a administração de Cg.

a) Efeito da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* sobre a migração de neutrófilos induzida por carragenina na pata de ratos

Esta abordagem foi realizada com o objetivo de investigar se o efeito antinociceptivo da CboL na hipernocicepção induzida por Cg envolvia inibição da migração de neutrófilos para pata estimulada. Para tanto, a migração de neutrófilos foi medida indiretamente pela quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo plantar dos animais por um ensaio cinético-colorimétrico descrito por SOUZA *et al.*, (1994) com algumas alterações. Os ratos receberam 15 min antes da carragenina i.pl. (100 µg/0,1 mL): salina e.v. (controle positivo) e CboL (1, 5 e 10 mg/kg) e.v. O controle negativo recebeu salina i.pl.

Após 3 horas da administração intraplantar da Cg amostras do tecido das patas dos animais foram coletadas, pesadas e trituradas em Politron Ultra-Max em solução (NaCl, NaPO₄, NaEDTA), sob condições adequadas de refrigeração. A seguir, foram centrifugadas a 13.000 g durante 15 minutos a 4 °C. O pellet obtido foi ressuscitado na mesma solução tampão e novamente centrifugado. O novo pellet obtido foi ressuscitado em uma segunda solução tampão (NaPO₄ e H-TBA), re-homogenizado, congelado e descongelado e centrifugado a 4 °C, durante 15 minutos, com frequência de 10.000 a 15.000 g. O sobrenadante foi colhido e

devidamente armazenado para posterior ensaio da MPO, utilizando placa de 96 poços e leitura da densidade óptica a 450 nm espectrofotômetro.

A atividade de MPO foi comparada a uma curva padrão de neutrófilos e os resultados foram apresentados como a atividade de MPO (número de neutrófilos/mg de tecido).

b) Efeito da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* sobre a concentração de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10) induzida por carragenina na pata de ratos

As concentrações das citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10) foram determinadas por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) em amostras de tecidos das patas dos animais pré-tratados com salina e CboL (5 mg/Kg) e.v. 15 min antes da administração da Cg i.pl. (100 μ g/0,1 mL). Grupo controle negativo recebeu somente salina i.p. Duas horas após a injeção da Cg as patas foram removidas e dissecadas, posteriormente, o tecido foi homogeneizado em 500 μ L de tampão contendo inibidores de proteases, centrifugado e o sobrenadante armazenado a -70 °C para posterior dosagem das citocinas como descrito no item 3.5.1.5.

3.6.4.2 Avaliação do efeito da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* sobre a hipernocicepção induzida por prostaglandina

A hipernocicepção foi mensurada como sendo a diferença obtida entre o tempo 0 (zero) e 3 (três) horas após a administração i.pl. de PGE₂ (100 ng/0,1mL) em ratos pré-tratados e.v. com CboL (5 mg/kg) ou salina (controle positivo) 15 minutos antes da administração do agente flogístico. A dose injetada de PGE₂ foi a menor dose que induziu hipernocicepção mecânica aguda máxima (FERREIRA *et al.*, 1978a, 1978b; 1988). Para a detecção de um possível envolvimento do sistema opióide na hipernocicepção, os animais foram pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, s.c.) 15 min antes CboL (5 mg/kg) ou salina. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada conforme descrito no item 3.6.4.

3.6.4.3 Modelo de hipernocicepção mecânica induzida por ovoalbumina em animais pré-imunizados

Os procedimentos de imunização utilizados neste experimento seguem metodologia descrita no item 3.5.2 como modificações nas doses utilizadas para imunização de ratos de acordo com CUNHA e colaboradores (2003). No 21^o (vigésimo primeiro), a hipernocicepção foi mensurada nos tempos 0 e 3 horas após administração i.pl de ovoalbumina (100 µg/0,1 mL) em ratos pré-tratados e.v. com salina (controle positivo) ou CboL (1, 5 e 10 mg/kg). O veículo (salina) também foi injetado i.pl. e os ratos falsos imunizados foram desafiados com OVA (controles negativos).

Para determinar o curso temporal do efeito da CboL sobre a hipernocicepção induzida por OVA em animais imunizados, CboL (5 mg/kg) foi administrada 15 minutos antes de OVA i.pl. sendo a hipernocicepção mecânica avaliada nos tempos: 1, 3, 5, 7, 12 e 24 horas após a administração de OVA.

a) Efeito da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* sobre migração de neutrófilos induzida com ovoalbumina nas patas de ratos

Com o objetivo de investigar se o efeito antinociceptivo da CboL na hipernocicepção induzida por OVA ocorria por inibição da migração de neutrófilos, esta foi medida indiretamente pela quantificação da atividade da MPO. Os ratos receberam 15 min antes da OVA i.pl. (100 µg/0,1 mL), salina e.v. (controle positivo) e CboL (5 mg/kg; e.v.). O controle negativo recebeu salina i.pl. Após 3 horas da administração intraplantar da OVA amostras do tecido das patas dos animais foram coletadas e processadas conforme 3.6.4.1 (a).

3.6.4.4 Avaliação da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* sobre o limiar basal dos animais no modelo de hipernocicepção

Com o objetivo de avaliar o efeito *per si* da lectina, a hipernocicepção foi mensurada sendo a diferença obtida entre o tempo 0 e até 5^a hora nos ratos que receberam pré-tratamento e.v. de CboL (5 mg/Kg) ou salina (controle positivo)

também foi utilizado sulfato de morfina (6 µg) (droga padrão). A intensidade de hipernocicepção foi quantificada conforme descrito no item 3.6.4.

3.6.5 Avaliação do efeito da lectina de *Canavalia boliviana* por diferentes vias de administração no modelo de hipernocicepção mecânica

3.6.5.1 Avaliação através da administração intratecal da lectina no modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina

Para verificar o envolvimento da lectina á nível espinhal foi realizada a administração por via intratecal (i.t.) da lectina em animais previamente anestesiados. As administrações i.t. foram realizadas de acordo com o método previamente descrito (MESTRE *et al.*, 1994) para ratos. Um volume de 10 µL com uma microseringa Hamilton entre as vértebras L5-L6. Reflexos espontâneos da cauda dos animais confirmavam a administração intratecal. Animais previamente anestesiados receberam CboL (100µg/i.t.) ou salina, 15 minutos antes da administração i.pl. de PGE₂ (100 ng/0,1mL). A intensidade de hipernocicepção foi quantificada conforme descrito no item 3.6.4.

3.6.5.2 Efeito de administração intra-cérebro-ventricular da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* em modelo de hipernocicepção induzida por carragenina

Para verificar o envolvimento da lectina á nível do sistema nervoso central foi realizada a administração por via intra-cerebro-ventricular (i.c.v.) da lectina em animais previamente anestesiados. Os animais foram adaptados ao aparelho estereotáxico tendo a cabeça fixada por intermédio de barras posicionadas no conduto auditivo. Previamente (2 minutos antes) à incisão no escalpo, a região onde o campo cirúrgico se encontrava era infiltrada subcutaneamente com solução contendo Lidocaína (2 %, sem adrenalina, anestésico local). Após a assepsia com álcool iodado, uma incisão longitudinal era realizada no escalpo para a exposição da

calota craniana. A seguir após uma incisão com objeto perfurante uma cânula guia era posicionada no ventrículo de acordo com coordenadas descritas por BUDANTSEV e colaboradores (1993). As administrações i.c.v. foram realizadas por meio de uma agulha injetora que excede em 1 mm o comprimento da cânula-guia, conectada a uma microseringa (Hamilton) de 10 uL. As drogas foram injetadas em um volume de 2,5 uL, durante um período de 1 minuto (visando minimizar os efeitos de aumentos no volume do líquido céfalo-raquidiano).

A hipernocicepção foi mensurada como sendo a diferença obtida entre o tempo 0 e 3 e 5 horas após a administração de CboL (30 µg/cav) ou salina, 15 minutos antes da administração i.pl. de Cg (100 µg/0,1mL). A intensidade de hipernocicepção foi quantificada conforme descrito no item 3.6.4.

a) Efeito da administração intra-cérebro-ventricular da lectina de *Canavalia boliviana* sobre a migração de neutrófilos nas patas de ratos estimuladas com carragenina

Com o objetivo de investigar se a administração intra-cerebro-ventricular de CboL inibiria a migração de neutrófilos para a pata do animal administrado com Cg i.pl., foi medida indiretamente pela quantificação da atividade da MPO nas patas dos animais conforme descrito no item 3.6.4.1.(a). Os ratos receberam 15 min antes da Cg i.pl. (100 µg/0,1mL): salina i.c.v. (controle positivo) e CboL i.c.v. (30 µg/cav) conforme procedimento descrito no item 3.6.5.2. Após 3 horas da administração intraplantar da Cg amostras do tecido das patas dos animais foram coletadas e processadas conforme 3.6.4.1 (a).

b) Avaliação dose resposta per si e modulação da administração intra-cerebro-ventricular da lectina de *Canavalia boliviana* no modelo de hipernocicepção

Com o objetivo de avaliar o efeito dose-resposta *per si* da administração intra-cerebro-ventricular da lectina, a hipernocicepção foi mensurada como sendo a diferença obtida entre o tempo 0 e 3 horas. Ratos previamente anestesiados que receberam pré-tratamento i.c.v. de CboL (10, 30 e 100µg/cav.) ou salina conforme

procedimento descrito no item 3.6.5.2. Para avaliação da participação do sistema opióide na hipernocicepção, CboL (30 µg/cav) na melhor dose utilizada, foi administrada 15 min antes do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, s.c.) ou salina. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada conforme descrito no item 3.6.4.

3.6.6 Teste do Rota Rod

Esta abordagem foi feita com o objetivo de verificar uma possível interferência da CboL na coordenação motora do animal. Para tanto, os animais foram pré-selecionados 24 horas antes da realização do experimento, ao serem individualmente posicionados no aparelho de rota rod (4 rotações por min). O animal que permaneceu 2 minutos na barra foi selecionado para estudo (DUNHAM e MYIA, 1957).

Os animais receberam CboL e.v. na dose de 1, 5 e 10 mg/Kg ou salina (grupo controle). Diazepam (2 mg/Kg; i.p.) foi utilizado como droga padrão no experimento. Após 30 min das injeções, os animais foram colocados na barra, individualmente, e registrado o tempo de permanência no aparelho durante 2 min. Os resultados foram expressos como o tempo (em segundos) de permanência do animal no aparelho \pm E.P.M.

3.6.7 Teste do campo aberto

A atividade motora (locomoção espontânea) dos animais foi verificada por meio de um campo aberto quadrangular, com 30 cm de lado, tendo demarcado em sua base 9 quadrados iguais com 10 cm de lado cada um. Os camundongos foram divididos em dois grupos: O grupo controle (tratado com salina e.v.) e o grupo tratado com CboL (1, 5 e 10 mg/kg). Após 30 minutos do tratamento, os animais foram levados individualmente para o campo aberto, ambientados por 1 minuto e, em seguida, observados por 4 minutos quanto ao número de campos explorados (CAPAZ *et al.*, 1981). Os resultados foram expressos como o total de campos explorados/4 min \pm E.P.M.

3.7 TOXICIDADE SUB-CRÔNICA

Para avaliação de possíveis efeitos tóxicos da CboL, foram utilizados dois grupos experimentais. Um grupo de camundongos recebeu uma solução de lectina (5mg/kg) diluída em solução salina durante quatorze dias por via e.v., obedecendo uma posologia de tomada diária única. O outro grupo de camundongos recebeu a mesma quantidade de solução salina pela mesma via e posologia.

Após os quatorze dias, os animais foram pesados e sua massa corporal comparada com o massa anterior (antes do tratamento) e o resultado sendo expresso como variação de massa corpórea antes e após os tratamentos. Em seguida, foi coletado sangue dos animais de ambos os grupos pelo plexo orbital para avaliação do leucograma e dosagens bioquímicas, sendo estes então sacrificados, e seus órgãos (fígado, coração, rim) removidos ainda úmidos e pesados. O peso de cada órgão foi expresso por cada 20 g de massa corporal e comparado ao grupo controle. O estômago dos animais foi também removido para avaliação macroscópica da possível presença de úlceras (SANTUCCI *et al.*, 1994).

Na avaliação do leucograma, uma gota de sangue foi colocada sobre lâminas para a confecção de esfregaços, corados pelo método HE, e destinados à contagem diferencial das células em microscópio óptico, utilizando a objetiva de imersão (aumento de 100 vezes). A contagem total foi feita de acordo com o método de SOUZA E FERREIRA (1985). Após este procedimento, obteve-se então o número de células x 10^6 / mL de sangue.

O restante da amostra de sangue foi centrifugado, e o plasma removido para realização das dosagens bioquímicas de uréia e creatinina como indicador de função renal e avaliação da atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), como indicadores da função hepática. As dosagens foram realizadas utilizando “Kits” específicos e dosadas pelo laboratório de Bioquímica do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foram realizadas

Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Além do teste-t Student para o restante das comparações. Nos resultados da atividade antinociceptiva foi realizada pelo teste-t Student – Neuman – Keuls. Para todas as análises foi considerado significativo $P < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

4.1.1 Lectina de *Canavalia boliviana* reduz migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos induzida por carragenina

Para iniciar a investigação da atividade antiinflamatória da CboL foram realizados experimentos de padronização das doses que seriam utilizados nos ensaios subseqüentes. A administração e.v. de CboL, 15 min antes do estímulo (Cg) reduziu a intensa migração de neutrófilos para cavidade peritoneal nas doses de 1, 5 e 10 mg/Kg após a 4ª hora da administração i.p. de Cg (500 µg/cav.). Essa inibição foi de 57, 59 e 71 % respectivamente. O grupo controle positivo (Cg) produziu um aumento significativo no número de neutrófilos, comparados ao grupo salina. (Figura 2).

4.1.1.1 Associação da lectina de *Canavalia boliviana* ao seu açúcar ligante (D-Glicose) reverte seu efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal

A administração i.p. de Cg (500 µg/cav.) induziu de forma significativa uma intensa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, quando comparado ao grupo controle nos quais os animais foram tratados somente com salina i.p. A migração foi inibida em 59 % nos animais tratados e.v. com CboL (5 mg/Kg) 15 minutos antes da aplicação do estímulo inflamatório. Por outro lado, a associação da lectina ao seu ligante específico D-Glicose reverteu o efeito provocado pela CboL neste modelo. Somente Glicose administrada e.v., não foi capaz de causar redução significativa do número de neutrófilos. (Figura 3).

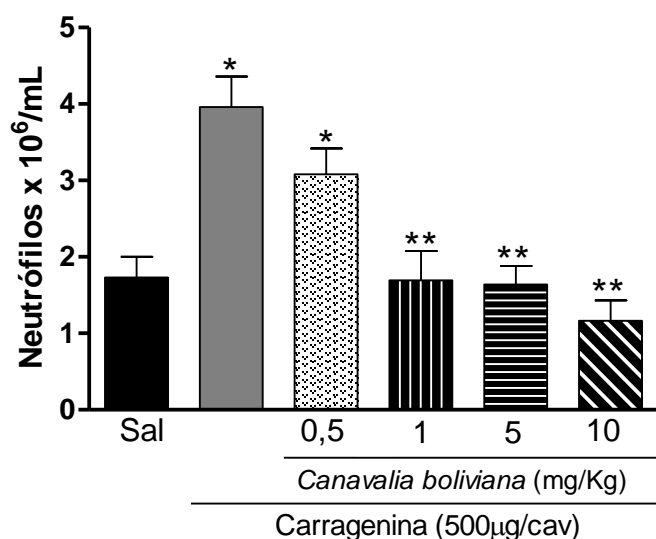


Figura 2– Lectina de CboL inibe a migração de neutrófilos induzida por carragenina para a cavidade peritoneal de camundongos. Os animais foram tratados e.v. com salina, ou CboL (0,5; 1, 5 e 10 mg/kg) 15 min antes de receberem Cg i.p. (500 µg/cav). A migração neutrofílica (MN) foi avaliada 4h depois da administração de Cg. Os animais controle negativo representam a MN induzida por salina i.p. Os valores são representados pela média ± E.P.M. do nº de neutrófilos (n=6). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina **comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).

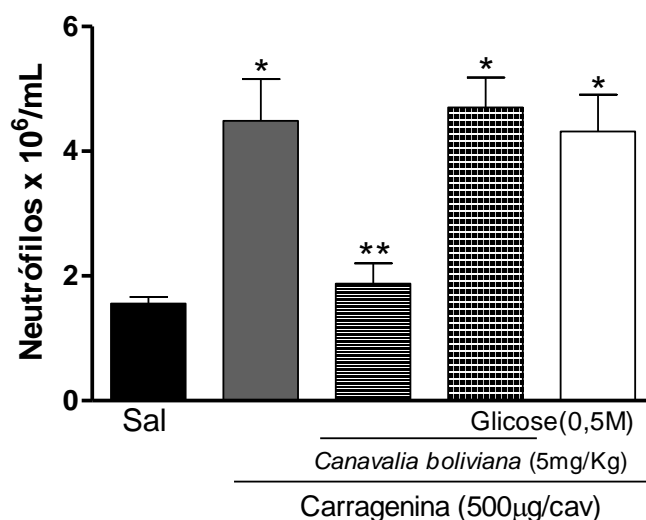


Figura 3 – Associação de CboL ao seu ligante (D-Glicose) reverte seu efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. Os animais receberam CboL (5 mg/Kg) sozinha ou em solução de D-Glicose, 15 minutos antes da injeção de Cg. O grupo controle positivo (Cg) recebeu salina e.v. e o grupo D-Glicose recebeu solução de D-Glicose e.v. (0,5M). A MN foi avaliada 4 horas após a Cg. Os valores são representados pela média ± E.P.M. do nº de neutrófilos (n=6). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina **comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).

4.1.1.2 Desnaturação térmica da lectina de *Canavalia boliviana* reverte seu efeito antiinflamatório no modelo de peritonite induzida por carragenina

A administração i.p. de Cg (500 µg/cav), induziu de forma significativa uma intensa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, quando comparado ao grupo controle, nos quais os animais foram tratados somente com salina i.p. CboL (5 mg/Kg; e.v.) diminuiu em 58% a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Entretanto, o tratamento térmico (100°C/10min) da CboL reverteu completamente o seu efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos (Figura 4).

4.1.1.3 Lectina de *Canavalia boliviana* reduz alterações da permeabilidade vascular em peritonite induzida por carragenina

A administração i.p. de Cg (500 µg/cav.) induziu um significativo aumento na permeabilidade vascular em relação ao grupo controle, observado através do extravasamento de corante (azul de Evans) para o fluido intraperitoneal. O pré tratamento endovenoso dos animais com CboL (5mg/Kg) reduziu de forma significativa a alteração de permeabilidade vascular (inibição 59%) na cavidade induzida por Cg (Figura 5).

4.1.1.4 Lectina de *Canavalia boliviana* diminui o rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério peritoneal de camundongos estimulados com carragenina

A administração de Cg (500 µg/cav) i.p. induziu um aumento significativo do rolamento e adesão de leucócitos no endotélio vascular do mesentério (vênulas mesentéricas pós-capilares; *in vivo*) quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas salina i.p. O tratamento e.v. com CboL (1, 5 e 10mg/kg), 15 min antes dos animais receberem o estímulo inflamatório (Cg), produziu redução significativa do rolamento (inibição de 44, 78 e 85% respectivamente. Figura 6 A) e adesão (inibição de 38, 69, 76% respectivamente) de leucócitos ao endotélio (Figura 6 B).

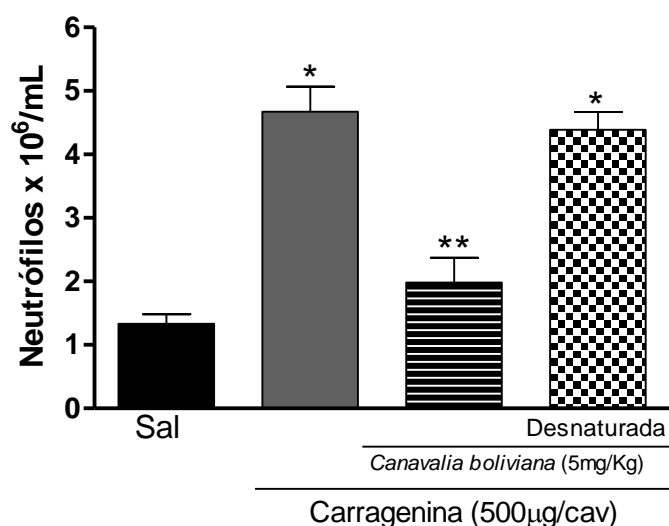


Figura 4 – Desnaturação térmica de CboL inibe sua atividade antiinflamatória no modelo de peritonite em camundongos. Os animais receberam CboL (5 mg/Kg; e.v.), desnaturada (100 °C/10 min) ou não, 15 min antes da administração i.p. de Cg (500 µg/cav). O grupo controle positivo (Cg) recebeu Cg i.p. e administração de salina e.v., e o controle negativo (Salina) salina i.p. Os valores são representados pela média ± E.P.M. do n. de neutrófilos (n=6). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina **comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).

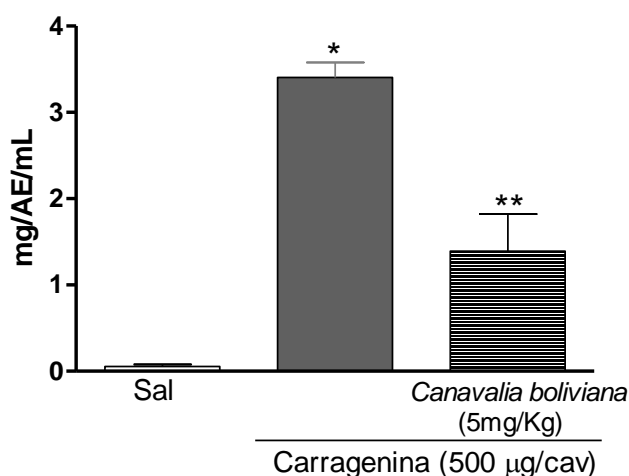


Figura 5 – Lectina de CboL reduz a alteração da permeabilidade vascular induzida por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos. Os animais foram tratados e.v. com salina ou CboL (5 mg/kg), 15 min. antes de Cg i.p. A permeabilidade vascular foi avaliada através da quantificação de azul de Evans (50 mg/kg) no fluido peritoneal após 3 horas da administração da Cg ou salina. Os resultados expressos como média de mg de azul de Evans/mL ± E.P.M. (n=6) * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina e ** comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).

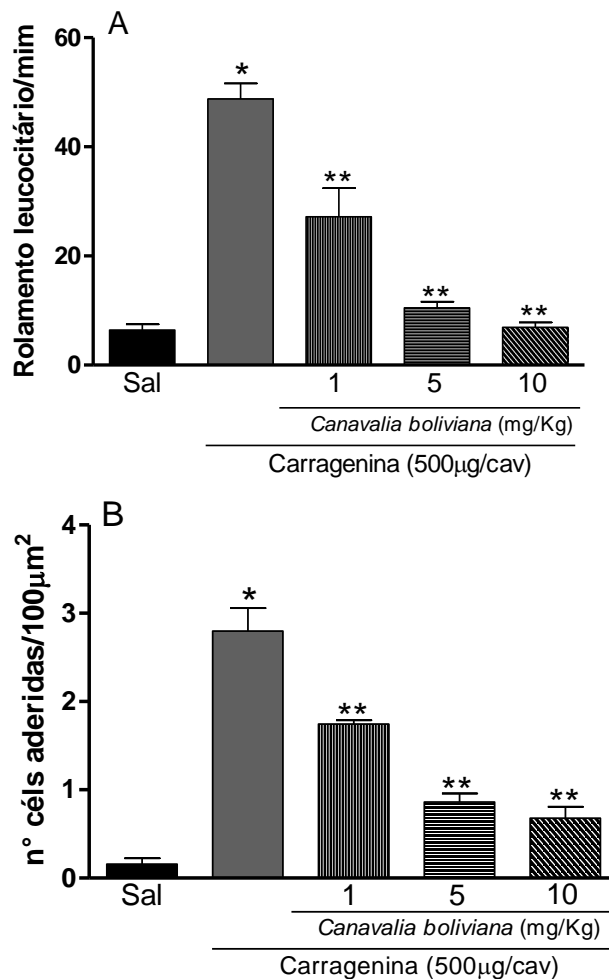


Figura 6 – Lectina de CboL diminui a rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos. Os animais foram tratados e.v. com salina ou CboL (1, 5 e 10 mg/kg), 15 min. antes de Cg i.p. O rolamento (Painel A) e a adesão (Painel B) de leucócitos foram avaliados por microscopia intravital mesentérica 2 e 4 horas, respectivamente após a administração da Cg ou salina. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. do n° de leucócitos/ min (painel A) e do n° de leucócitos aderidos/100 mm².(painel B) (n=6).* indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina e ** comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).

4.1.1.5 Lectina de *Canavalia boliviana* reduziu as concentrações de TNF- α e IL-1 β e aumentou IL-10 no sangue de camundongos estimulados com carragenina

O agente inflamatório (Cg), quando administrado i.p., induziu um aumento significativo nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e citocina antiinflamatória (IL-10), quando comparados ao grupo controle. O pré-tratamento e.v. com a CboL na dose de 5 mg/Kg foi capaz de promover diminuição de forma significativa nas concentrações de TNF- α e IL-1 β (32 e 41 % respectivamente, Figura 7 A e B) e um aumento na concentração de IL-10 (49 %, Figura 7 C) .

4.1.1.6 Tratamento com a lectina *Canavalia boliviana* não alterou concentração de óxido nítrico

A lectina de CboL não alterou significativamente a concentração de nitrito em soro de animais com peritonite induzida por Cg. O grupo controle que recebeu somente salina apresentou baixos níveis de nitrito no soro. A administração de Cg não modificou de forma significativa os níveis de nitrito em relação ao grupo tratado com Salina (Figura 8).

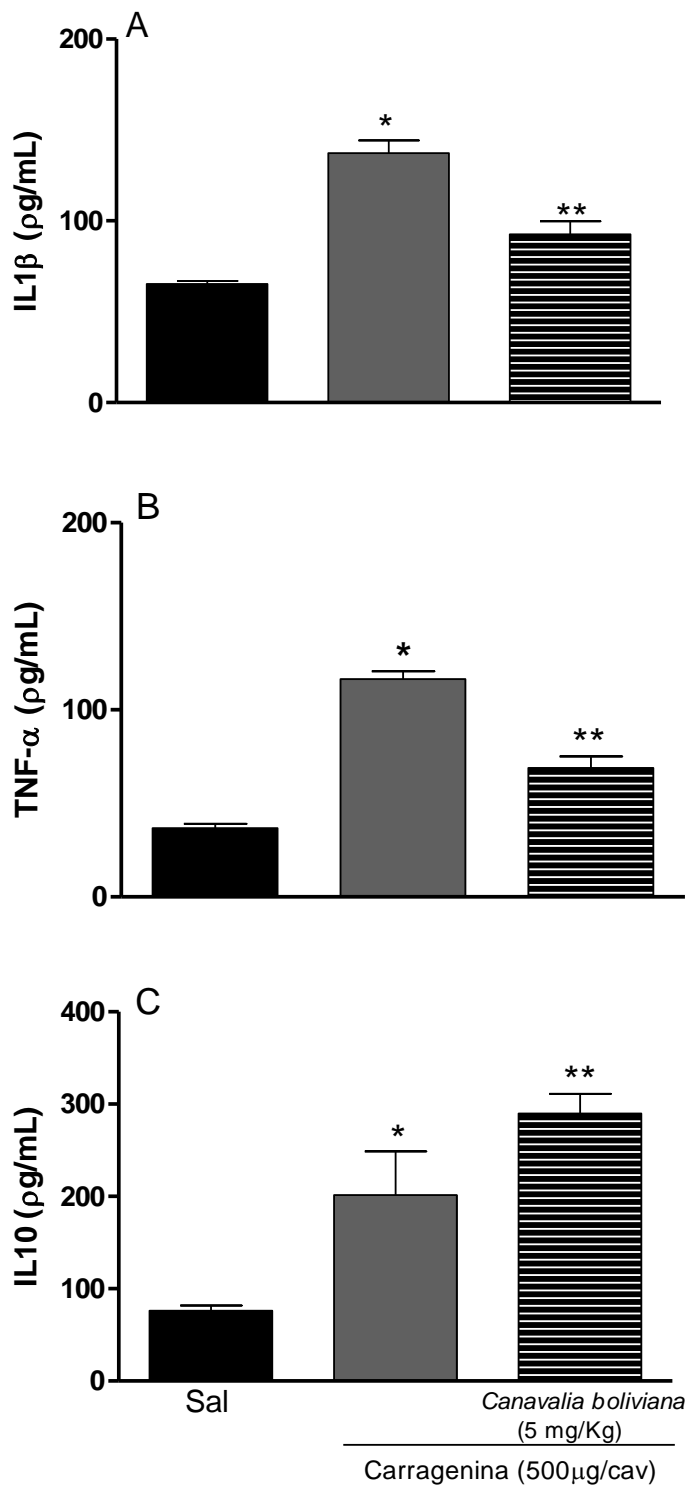


Figura 7 – Lectina de CboL reduz as concentrações de IL-1β e TNF-α e aumenta concentração de IL-10 no sangue em camundongos estimulados com carragenina. PAINEL A – Concentração de IL-1 β. **PAINEL B-** Concentração de TNF-α. **PAINEL C –** Concentração de IL-10. Os animais receberam e.v. salina ou CboL (5 mg/kg) 15 minutos antes da Cg i.p. (500 μg/cav.). Os animais controle receberam apenas salina i.p. A concentração de citocinas foi determinada por ELISA. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de pg de citocina/mL no soro (n=5). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina e ** comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).

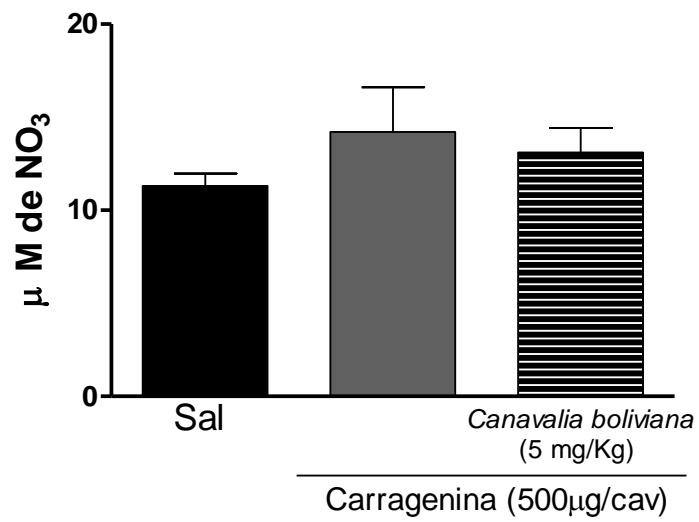


Figura 8 – Lectina de *Canavalia boliviana* não altera concentração de NO no sangue de camundongos. Os animais foram tratados e.v. com CboL (5 mg/Kg) ou salina (controle positivo) 15 min antes da Cg i.p. (500 µg/cav.). O controle negativo (Sal) recebeu somente salina i.p. Após 4 horas da Cg, o soro dos animais foi coletado para dosagem de nitrito através da reação de Griess. As barras representam a média ± E.P.M. da concentração de nitrito em µM (n=6). (ANOVA, teste de Bonferroni).

4.1.2 Lectina de *Canavalia boliviana* reduz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por ovoalbumina em camundongos imunizados

Em acréscimo ao efeito da CboL sobre a migração de neutrófilos induzida por um agente inflamatório inespecífico (Cg), avaliou-se também o efeito da CboL sobre a migração de neutrófilos em modelo de inflamação imune induzida por OVA em animais pré-imunizados. A administração de OVA (10 μ g/cavidade; i.p.) nos camundongos imunizados, induziu uma intensa e significativa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal destes animais, quando comparado com os animais falso imunizados. O tratamento e.v. com CboL (1, 5 e 10 mg/kg), 15 min antes de receberem o estímulo inflamatório (OVA) reduziu de forma significativa a migração de neutrófilos. Tal redução foi de 61, 76 e 77%, respectivamente (Figura 9).

4.1.3 Lectina de *Canavalia boliviana* inibe quimiotaxia induzida por MIP-2 *in vitro*

A pré-incubação dos neutrófilos com CboL (30, 100 e 300 μ g/mL) inibiu de forma significativa a quimiotaxia de neutrófilos em câmara de Boyden induzida por MIP-2 (inibição de 77, 90 e 94% respectivamente). Adicionalmente o controle negativo, (RMPI) não provocou significativa migração de neutrófilos (Figura 10).

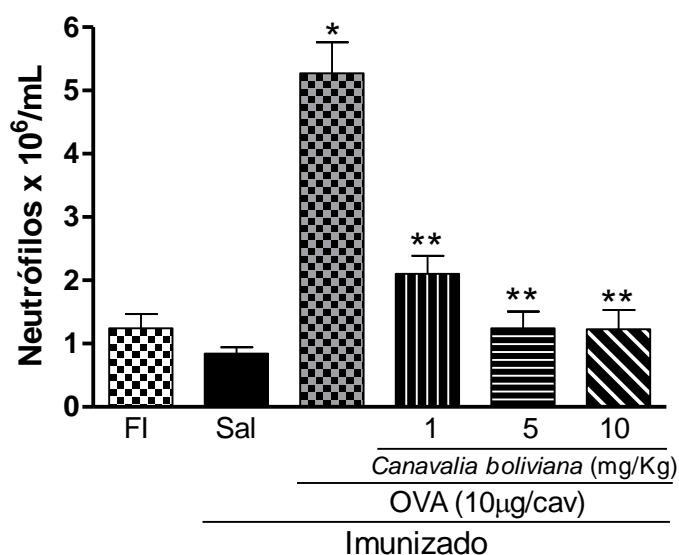


Figura 9 – Lectina de CboL reduz migração de neutrófilos induzida por ovoalbumina em camundongos imunizados. Os camundongos imunizados foram tratados e.v. com salina ou CboL (1, 5 e 10 mg/kg) 15 min antes de receberem ovoalbumina (OVA) (10 µg/cav i.p.). No controle, os animais falso-imunizados (FI) também foram desafiados com OVA (10 µg/cav i.p.) e os animais imunizados também receberam salina (Sal). A migração de neutrófilos foi determinada 4 horas após a OVA. Os resultados são expressos com média ± E.P.M. do nº de neutrófilos/cav (n=6). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo Sal e FI; ** comparado ao grupo imunizado e administrado com OVA (ANOVA, teste de Bonferroni).

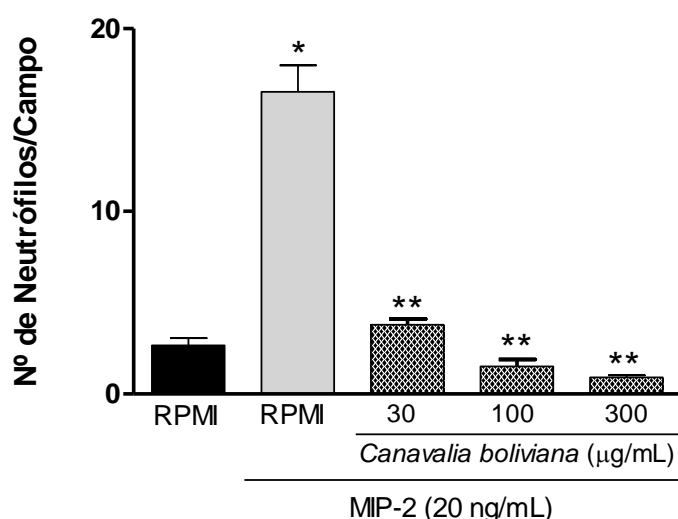


Figura 10 – Lectina de CboL inibe quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. MIP-2 foi utilizada como agente quimiotático em microcâmara. Os neutrófilos foram incubados com CboL (30, 100 e 300 µg/mL) 30 min antes da adição de MIP-2. O grupo controle foi estimulado com RPMI (controle negativo). Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. do nº de neutrófilos por campos de um total de cinco campos. *P<0,05 comparado ao grupo controle RPMI ** comparado ao grupo RPMI estimulado. (ANOVA, teste de Bonferroni).

4.2. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

4.2.1 Lectina de *Canavalia boliviana* diminui a frequência de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos

CboL nas doses de 1, 5 e 10 mg/Kg foi capaz de reduzir, significativamente, o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético quando comparados ao grupo controle. Essa redução foi de 60, 63 e 64 %, respectivamente. Morfina também reduziu (90 %) significativamente as contorções abdominais (Figura 11).

4.2.2 Lectina de *Canavalia boliviana* apresenta atividade antinociceptiva nas fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina

Formalina (1,2 %) administrada por via intraplantar produziu um aumento no tempo de lambertura da pata tanto na primeira (0-5 min; neurogênica) quanto na segunda fase (20-25 min; inflamatória). A lectina de sementes de *Canavalia boliviana* (CboL) administrada por via e.v. nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg reduziu de forma significativa o tempo de lambertura da pata na primeira fase (inibição de 33, 42 e 45 %, respectivamente) e segunda fase (inibição de 79, 55 e 51 %, respectivamente). Morfina foi utilizada como droga controle e reduziu de forma significativa o tempo de lambertura na primeira (inibição de 71 %) e segunda fase (inibição de 98 %) do teste (Tabela 2).

4.2.3 Lectina de *Canavalia boliviana* apresenta atividade antinociceptiva central avaliada pelo teste da placa quente

Resultados demonstram (Tabela 3) que a lectina de *Canavalia boliviana* administrada por via e.v. na dose de 1, 5 e 10 mg/kg aumentou de forma significativa o tempo de latência dos camundongos na placa nos tempos avaliados de 30; 60; 90 e 120 minutos comparados com o grupo controle (CboL 1 mg/Kg, 30 min: 78 %; 60 min: 66 %; 90 min: 64 %; 120 min: 55 %. CboL 5 mg/Kg, 30 min: 91 %; 60 min: 133 %; 90 min: 93 %; 120 min: 79 %. CboL 10 mg/Kg, 30 min: 102 %; 60 min: 133 %; 90

min: 103 %; 120 min: 100 %). Morfina foi utilizada como droga controle, e aumentou a latência dos animais na placa durante os tempos de 30, 60 e 90 minutos (134, 173 e 122 %, respectivamente). Como era de se esperar, o efeito antinociceptivo da morfina foi bloqueado pela naloxona. A administração da CboL (5 mg/Kg) associada á naloxana bloqueou o efeito antinociceptivo da lectina, sugerindo assim envolvimento de receptores opióides na resposta antinociceptiva da CboL.

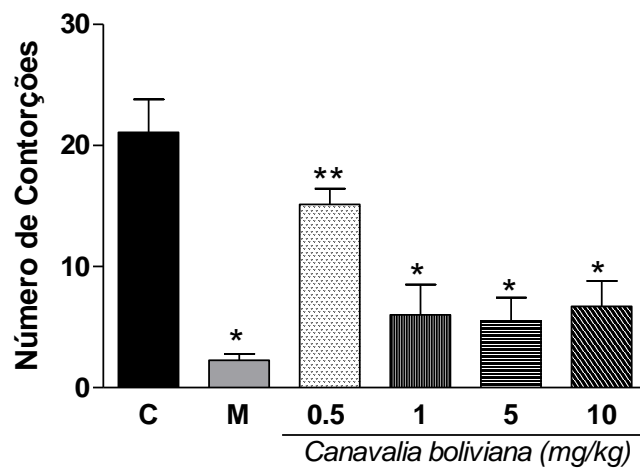


Figura 11 – Lectina de CboL reduz o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. A nocicepção foi mensurada imediatamente após injeção de ácido acético (AC; 0,6%) na cavidade peritoneal dos camundongos. Morfina (5 mg/Kg; s.c.) ou CboL (0,5; 1, 5 e 10 mg/kg; e.v.) foram administrados 15 min antes do AC. O grupo controle (salina) recebeu apenas AC. Os resultados são expressos com média \pm E.P.M. do nº de contorções abdominais (n=8). * indica significância estatística ($P < 0.05$) comparado ao grupo controle (salina); ** comparado somente ao grupo Morfina (Test Student – Neuman – Keuls).

| Tratamento | Tempo de lambedura (s) | | | |
|--------------------------------------|------------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | Fase Neurogênica | | Fase Inflamatória | |
| | 1ª Fase | Inibição (%) | 2ª Fase | Inibição (%) |
| Salina | 60,9 ± 5,2 | - | 39,4 ± 4,9 | - |
| Morfina ^a (5 mg/Kg; s.c.) | 17,3 ± 3,4* | 71 | 0,9 ± 0,5* | 98 |
| CboL ^a 1 (mg/Kg; i.v.) | 40,6 ± 5,8* | 33 | 8,1 ± 3,0* | 79 |
| CboL ^a 5 (mg/Kg; i.v.) | 35,1 ± 4,9* | 42 | 15,5 ± 2,6* | 61 |
| CboL ^a 10 (mg/Kg; i.v.) | 33,1 ± 5,3* | 45 | 17,8 ± 4,1* | 55 |

Tabela 2. Efeito da CboL no teste da formalina em camundongos. Os animais foram tratados 15 min antes da injeção de formalina (1,2 %) com salina (controle; e.v.) ou morfina (5 mg/Kg; s.c.) ou CboL (1, 5 e 10 mg/Kg, e.v.), respectivamente. Imediatamente após a administração da formalina o tempo de lambedura foi registrado por cerca de 5 min (1ª fase) e de 20 à 25 min (2ª fase). Os valores representam a média ± E.P.M do tempo de lambedura em segundos de cada fase (n=10). Foram utilizados 6-11 animais por grupo. * P<0,05 indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle (Salina). (Test Student – Neuman – Keuls).

| Tratamento | Tempo de reação (s) | | | | | |
|--|---------------------|-----------|-----------|-------------|-----------|----------|
| | 0 min | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min | 150 min |
| Salina | 18,2±1,9 | 17,7±1,9 | 14,5±1,4 | 15,3± 2,2 | 14,3±1,3 | 17,4±3,5 |
| Morfina ^a (5mg/Kg; s.c.) | 14,7±0,9 | 41,5±3,6* | 39,6±5,4* | 34,0±6,4* | 19,8±2,2 | 17,6±4,8 |
| Naloxona ^a (1 MG/Kg; s.c.) | 16,4±2,2 | 17,6±3,8 | 18,2±1,8 | 13,4±2,5 | 13,6±2,9 | 12,6±3,3 |
| CboL ^a 1mg/kg (i.v.) | 15,9±1,9 | 31,6±3,5* | 24,1±2,1* | 25,2±24,0* | 22,3±3,9* | 18,4±2,6 |
| CboL ^a 5 mg/kg (i.v.) | 15,2±3,5 | 33,9±3,1* | 33,8±2,5* | 29,6 ± 2,8* | 25,6±3,3* | 18,9±4,1 |
| CboL ^a 10 mg/kg (i.v.) | 16,1±4,5 | 35,8±4,4* | 34,6±5,3* | 31,2±4,4* | 28,6±4,1* | 19,3±4,4 |
| CboL ^a 1 + Naloxona ^b | 15,6±3,3 | 17,1±2,2 | 15,7±3,3 | 16,2±2,7 | 16,7±3,6 | 15,8±3,1 |
| Morfina ^a + Naloxona ^b | 15,8±1,2 | 10,0±2,6 | 11,6±3,2 | 12,8±2,1 | 14,5±1,9 | 17,0±2,1 |

Tabela 3. Efeito da CboL no teste da placa quente em camundongos. Os animais foram tratados 15 min antes do teste com salina (controle positivo; e.v.) ou morfina (5 mg/Kg; s.c.; controle negativo) ou CboL (1, 5 e 10 mg/Kg; e.v.), respectivamente. O tempo de reação que consiste em os animais saltarem ou lamberem as patas traseiras após serem colocados na placa quente (51 ± 0,5 °C) foi registrado antes (t=0) e 30, 60, 90, 120 e 150 min após o tratamento. Os valores representam a média ± E.P.M. do tempo de reação em segundos (s). Foram utilizados 9 animais por grupo. * P<0,05 indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle. (Test Student – Neuman – Keuls).

4.2.4 Lectina de *Canavalia boliviana* reduz de forma tempo-dependente a hipernocicepção mecânica induzida por carragenina em ratos

A administração i.pl. de carragenina (100 µg/0,1 mL) na pata traseira direita dos ratos promoveu um significativo hipernocicepção mecânica quando comparado aos animais que receberam apenas salina por via intraplantar. Este efeito foi observado pelo aumento da diferença do limiar de retirada nos animais tratados com Cg, em relação ao grupo tratado somente com salina (controle). O pré-tratamento e.v. com CboL nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg, 15 min antes da administração de Cg, inibiu a hipernocicepção mecânica induzida pela Cg (inibição de 41, 56 e 61 %, respectivamente, Figura 12 A). CboL na dose de 5mg/kg 15 min antes da administração de Cg, foi avaliada numa curva tempo-resposta onde a inibição da hipernocicepção foi significativa 1ª hora após a administração de CboL alcançando um platô na 3ª hora em relação ao grupo Cg, retornando aos níveis normais 12 horas após (Figura 12 B).

a) Lectina de *Canavalia boliviana* reduz a migração de neutrófilos induzida por carragenina na pata de ratos

A migração de neutrófilos foi mensurada através da dosagem de MPO no tecido da pata dos animais. A administração i.pl. de Cg (100 µg/pata) induziu intenso acúmulo de neutrófilos para o interior da pata dos animais. O pré-tratamento e.v. com CboL (1, 5 e 10 mg/kg) 15 min antes da administração intraplantar de Cg reduziu de forma significativa o acúmulo de neutrófilos na pata dos animais (44, 50 e 54 %, inibição) (Figura 13).

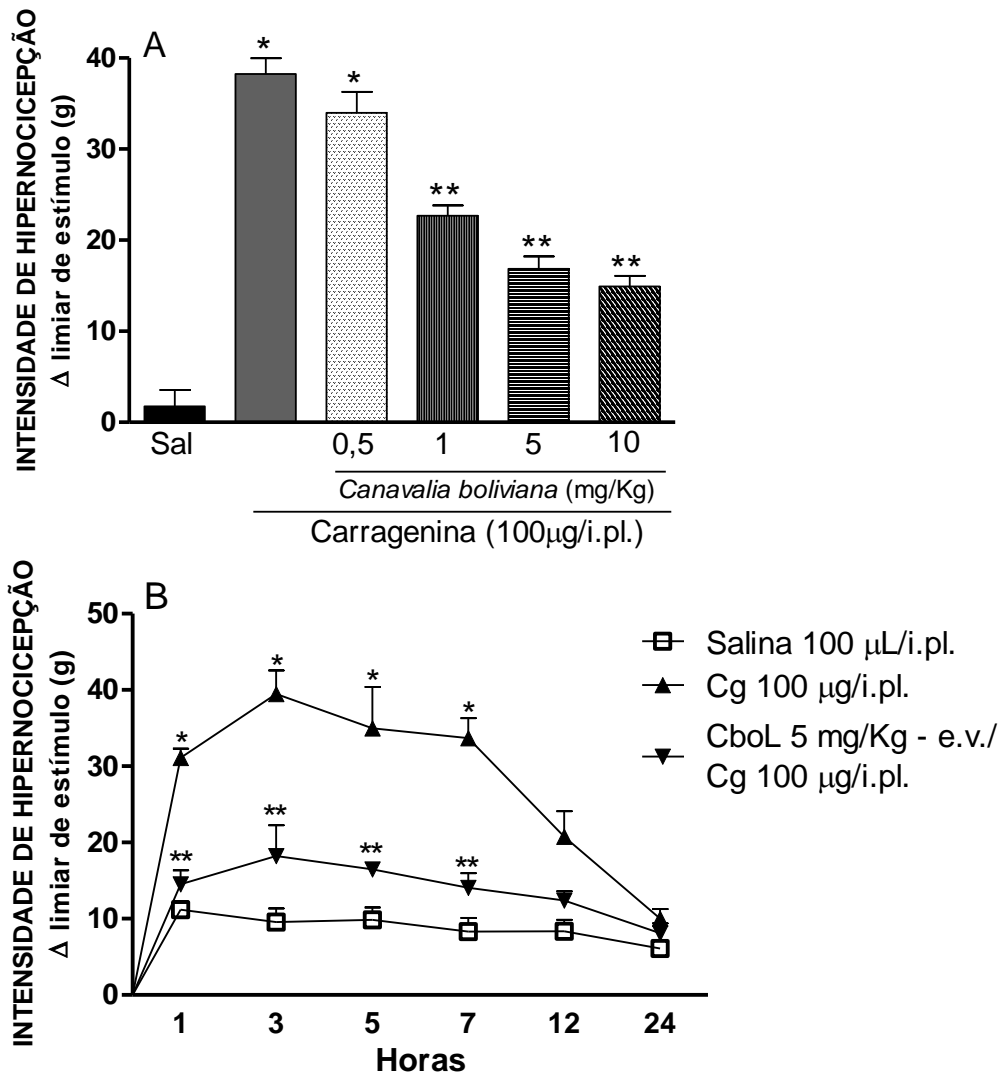


Figura 12 – Lectina de CboL reduz de forma tempo-dependente a hipernociceção mecânica induzida por carragenina. PAINEL A - A hipernociceção foi mensurada antes e 3 horas após administração de Cg (100 μg/0,1 mL) nas patas traseiras de ratos. Salina ou CboL (0,5; 1, 5 e 10 mg/kg) foi injetada e.v. 15 minutos antes da administração do estímulo. **PAINEL B** – curva tempo-resposta da hipernociceção induzida por Cg. Salina ou CboL (5 mg/kg) foram administradas e.v. 15 minutos antes da administração do estímulo (Cg). Os resultados são expressos com média ± E.P.M. da intensidade de hipernociceção (Δ limiar de estímulo, g) (n=5). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina; **comparado ao grupo carragenina (ANOVA, teste de Bonferroni).

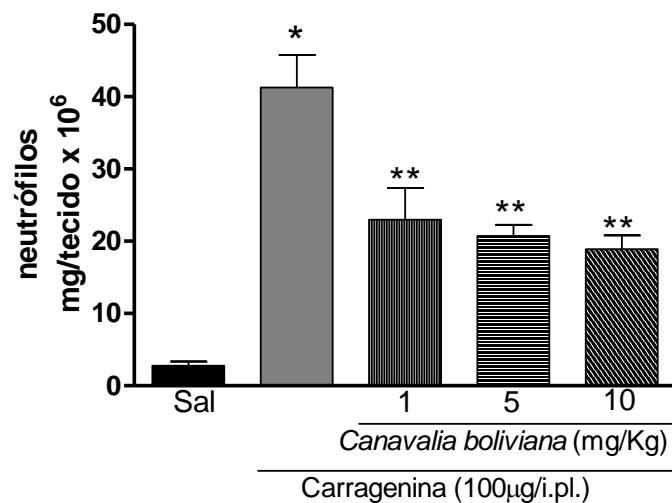


Figura 13 – Lectina de CboL reduz o influxo de neutrófilos na pata de ratos estimulados com carragenina. Veículo (salina) ou CboL (1, 5 e 10 mg/kg) foram administrados e.v., e 15 minutos depois, Cg i.pl. (100 μg/0,1 mL) foi administrado na pata traseira dos animais. O grupo controle negativo recebeu apenas salina. A atividade da mieloperoxidase na pata traseira foi usada como um indicador do influxo de neutrófilos. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. do n° de neutrófilos (n=6). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina, ** comparado ao grupo carragenina (ANOVA, teste de Bonferroni).

b) Lectina de Canavalia boliviana não interfere nas concentrações de IL-1 β , TNF- α e IL-10 nas patas de ratos estimulados com carragenina

O agente inflamatório (Cg), quando administrado i.pl, induziu um aumento significativo nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e citocina antiinflamatória (IL-10), quando comparados ao grupo que recebeu somente salina. O pré-tratamento e.v. com a CboL na dose de 5 mg/Kg não foi capaz de promover diminuição de forma significativa nas concentrações de TNF- α e IL-1 β e um aumento na concentração de IL-10 (Figura 14).

4.2.4.1 Lectina de Canavalia boliviana reduz a hipernocicepção mecânica induzida por prostaglandina e demonstra envolvimento com sistema opióide

A administração i.pl. PGE₂ (100 ng/0,1 mL) na pata traseira direita dos ratos promoveu um significativo efeito hipernociceptivo quando comparado aos animais que receberam apenas salina por via intraplantar. Este efeito foi observado pelo aumento da diferença do limiar de retirada nos animais tratados PGE₂, em relação ao grupo tratado somente com salina (controle). O pré-tratamento e.v. com CboL na dose de 5 mg/kg, 15 min antes da administração de PGE₂, inibiu a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂ (inibição de 41 %) (Figura 15 A).

Os animais que receberam CboL (5 mg/Kg) e.v. após pré-tratamento com naloxona (1 mg/Kg; s.c.), 15 min antes da administração de PGE₂, apresentaram seu efeito significativamente abolido em relação ao animais que receberam apenas CboL com administração i.pl. de PGE₂ (Figura 15 B), demonstrando mais uma vez o envolvimento de receptores opióides.

4.2.4.2 Lectina de Canavalia boliviana reduz de forma tempo dependente a hipernocicepção mecânica induzida por ovoalbumina em ratos imunizados.

Após a administração intraplantar de OVA (100 μ g/0,1 mL) nos ratos imunizados ocorreu um significativo efeito nociceptivo quando comparado aos animais falso imunizados. Este efeito foi observado pelo aumento na diferença do limiar de retirada nos animais tratados com OVA. O tratamento e.v. com CboL (1, 5 e

10 mg/kg), 15 min antes dos animais receberem o estímulo nociceptivo (OVA) reduziu de forma significativa o limiar de retirada (redução de 40, 49 e 58 %, respectivamente) (Figura 16).

CboL na dose de 5 mg/kg 15 min antes da administração de OVA, foi avaliada numa curva tempo-resposta aonde a inibição da hipernocicepção foi significativa 1ª hora após a administração de CboL alcançando um platô na 3ª hora em relação ao grupo OVA, retornando aos níveis normais (não significativa) 12 horas após (Figura 16 B).

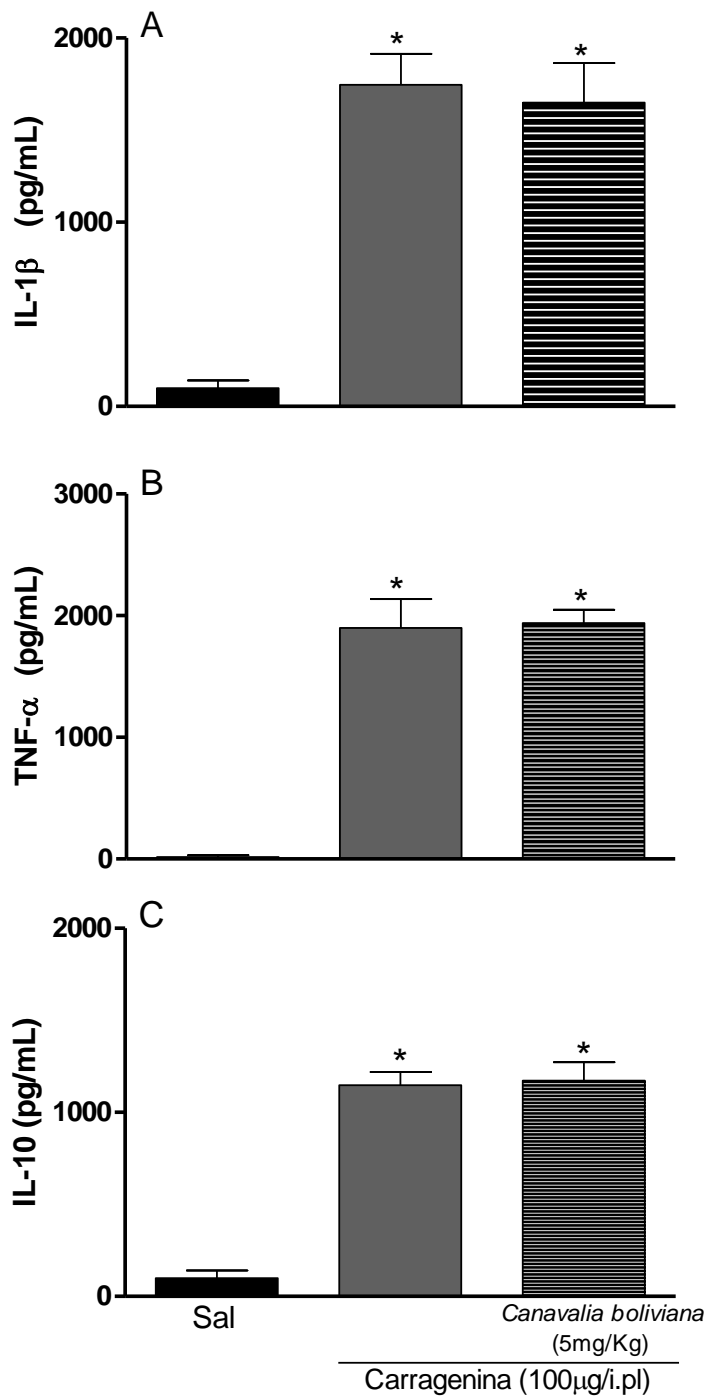


Figura 14 – Lectina de CboL não altera as concentrações de IL-1 β , TNF- α e IL-10 na pata de ratos estimulados com carragenina. PAINEL A – Concentrações de IL-1 β . PAINEL B – Concentrações de TNF- α . PAINEL C – Concentrações de IL-10 Os animais receberam salina ou CboL (5 mg/kg) e.v. 15 minutos antes da administração Cg i.pl. (100 μ g/0,1 mL). As concentrações das citocinas foram determinadas por ELISA. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. de pg de citocina/mL (n=5). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina. (ANOVA, teste de Bonferroni).

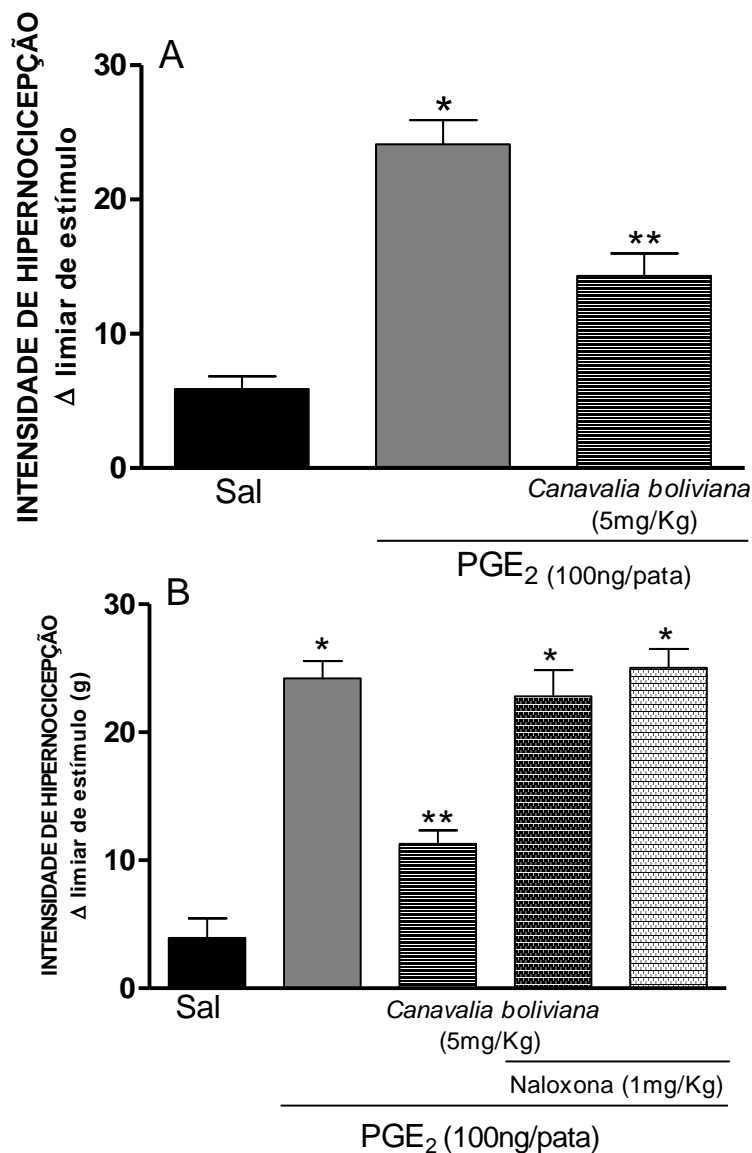


Figura 15 – Lectina de CboL reduz hipernocicepção mecânica induzida por prostaglandina demonstrando possível envolvimento de sistema opióide. PAINEL A - A hipernocicepção foi mensurada antes e 3 horas após a injeção de PGE₂ (100 ng/i.pl.) nas patas traseiras de ratos. Salina ou CboL (5 mg/kg) foram administradas e.v. 15 minutos antes da administração do estímulo. **PAINEL B** - Salina, CboL (5 mg/kg) foram administrada e.v. 15 minutos antes do estímulo, em animais pré-tratados com naloxona (1 mg/kg; s.c.). Os resultados são expressos com média ± E.P.M. da intensidade de hipernocicepção (Δ limiar de estímulo, g) (n=5). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina; **comparado ao grupo carragenina (ANOVA, teste de Bonferroni).

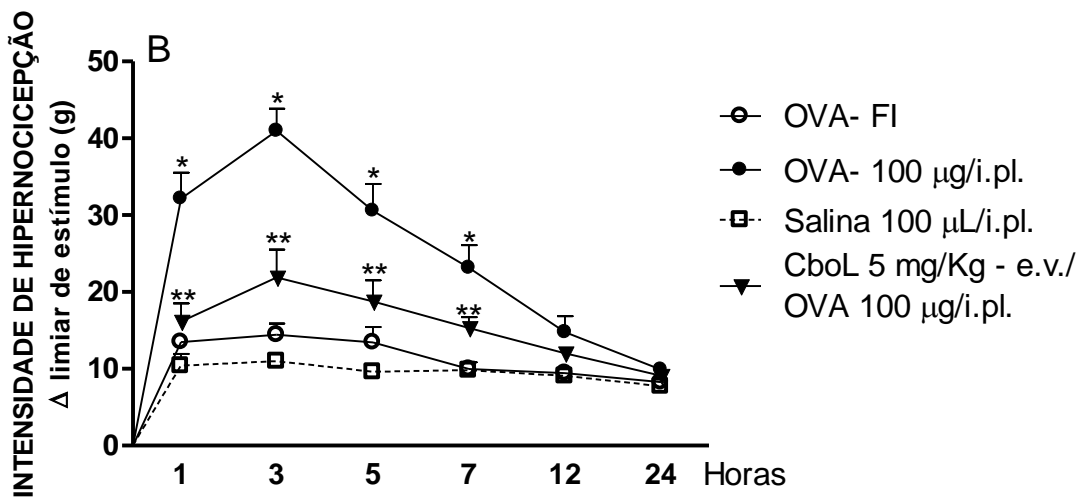
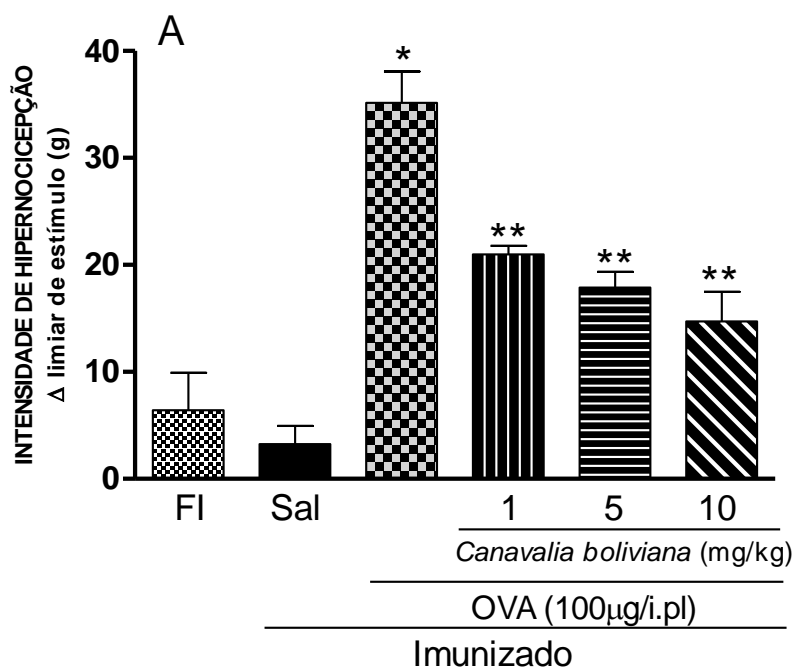


Figura 16 – Lectina de CboL reduz de forma tempo-dependente a hipernocicepção mecânica induzida por ovoalbumina. PAINEL A - A hipernocicepção foi mensurada 0 e 3 horas após injeção nas patas traseiras de ratos de OVA i.pl. (100 µg/0,1 mL). Salina ou CboL (1, 5 e 10 mg/kg) foram administradas e.v. 15 minutos antes do estímulo. **PAINEL B** – Salina ou CboL (5 mg/kg) foram administradas e.v. 15 minutos antes do estímulo (OVA). Os resultados são expressos com media ± E.P.M. da intensidade de hipernocicepção (Δ limiar de estímulo, g) (n=5). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina; **comparado ao grupo OVA (ANOVA, teste de Bonferroni).

a) O influxo de neutrófilos induzido pela administração de ovoalbumina em ratos imunizados é reduzido pela lectina de *Canavalia boliviana*

A migração de neutrófilos foi mensurada através da dosagem de MPO no tecido da pata dos animais. A administração de OVA i.pl. (100 µg/0,1mL) induziu intenso acúmulo de neutrófilos para o interior da pata dos animais. O pré-tratamento e.v. com CboL 5 mg/kg (e.v.) 15 min antes da administração intraplantar de OVA reduziu de forma significativa o acúmulo de neutrófilos na pata dos animais 46 % inibição (Figura 17).

4.2.4.3 Efeito da lectina de *Canavalia boliviana* sobre o limiar basal dos animais em modelo de hipernocicepção

No intuito de avaliar limiar basal da lectina na hipernocicepção, animais receberam e.v. controle (salina), sulfato de morfina como droga padrão. Morfina demonstrou um significativo efeito anti-hipernociceptivo, este efeito mostrou-se 30 minutos após a administração atingindo seu platô 60 minutos após sua administração. O pré-tratamento e.v. com CboL (5 mg/kg), mostrou efeito anti-hipernociceptivo significativo 30 minutos após a administração atingindo seu platô na 3^a hora, retornando aos níveis dos animais administrados com salina 5 horas após a administração de CboL (Figura 18).

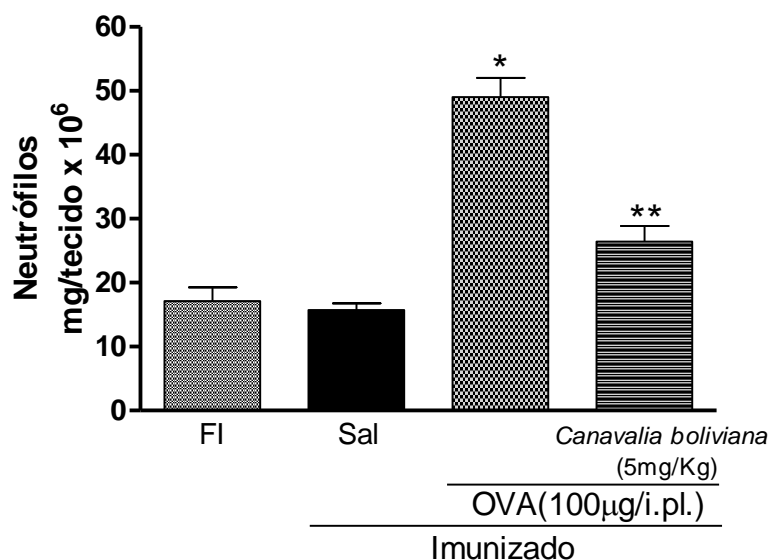


Figura 17 – Lectina de CboL reduz o influxo de neutrófilos na pata de ratos imunizados e estimulados com ovoalbumina. Salina ou CboL (5 mg/kg) foram administradas e.v., e 15 minutos antes da administração do estímulo OVA i.pl (100 µg/i.pl) nos animais previamente imunizados (21 dias). O grupo controle negativo recebeu apenas salina (Falso imunizado). A atividade da mieloperoxidase na pata traseira foi usada como um indicador do influxo de neutrófilos. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. do nº de neutrófilos (n=6). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina, ** comparado ao grupo OVA (ANOVA, teste de Bonferroni).

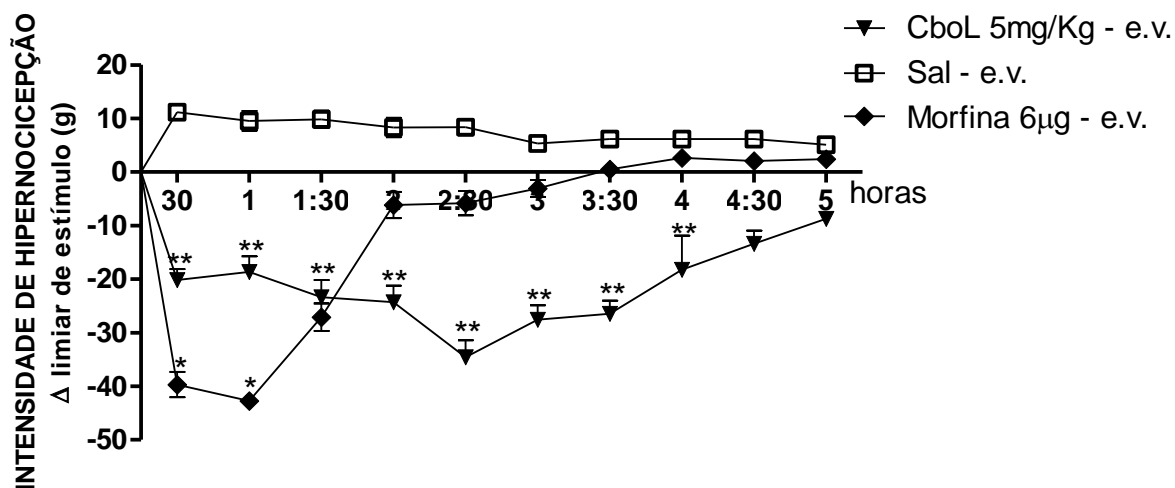


Figura 18 – Efeito da lectina CboL sobre o limiar basal dos animais no modelo de hipernocicepção. A hipernocicepção foi mensurada nos tempos de 30 minutos até 5 horas após a administração e.v. de CboL (5 mg/kg) administrada 15 minutos antes do início do teste. Em grupos controle, Salina e Sulfato de Morfina (6µg) foram administrados e.v. Os resultados são expressos com media ± E.P.M. da intensidade de hipernocicepção (Δ limiar de estímulo, g) (n=5). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina; **comparado ao grupo morfina (ANOVA, teste de Bonferroni).

4.2.5 Avaliação do efeito da lectina de *Canavalia boliviana* por diferentes vias de administração no modelo de hipernocicepção mecânica.

4.2.5.1 Administração intratecal da lectina de *Canavalia boliviana* não reduz hipernocicepção induzida por prostaglandina

A administração i.pl. PGE₂ (100 ng/pata) na pata traseira direita dos ratos promoveu um significativo efeito nociceptivo quando comparado aos animais que receberam apenas salina por via intraplantar. Este efeito foi observado pelo aumento da diferença do limiar de retirada nos animais tratados PGE₂, em relação ao grupo tratado somente com salina (controle). O pré-tratamento i.t. com CboL na dose de 100 µg/cav, 15 min antes da administração de PGE₂, não inibiu a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂ (Figura 19).

4.2.5.2 Lectina de *Canavalia boliviana* administrada intra-cerebro-ventricular reduz hipernocicepção induzida por carragenina

A administração i.pl. de Cg (100 µg/0,1 mL) na pata traseira direita dos ratos promoveu um significativo efeito nociceptivo quando comparado aos animais que receberam apenas salina i.pl. Este efeito foi observado pelo aumento da diferença do limiar de retirada nos animais tratados com Cg, em relação ao grupo tratado somente com salina (controle). O pré-tratamento i.c.v. com CboL (30 µg/cav) inibiu a hipernocicepção induzida por Cg nos tempos de 1, 3 e 5 horas, alcançando um platô na 1 hora após a administração de Cg (Figura 20).

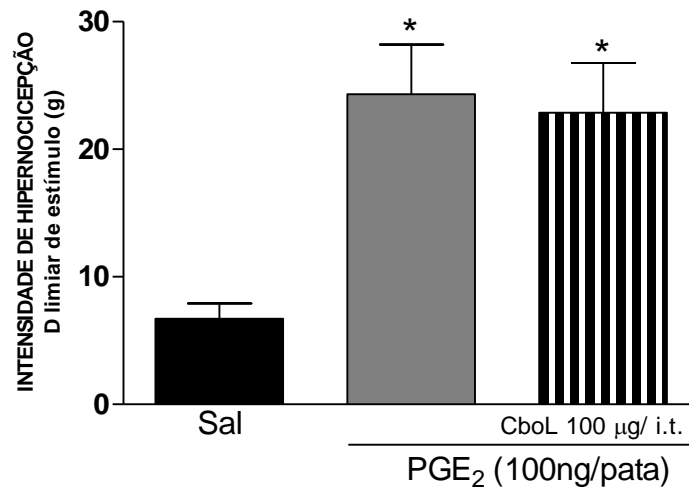


Figura 19 – Lectina de CboL administrada por via intratecal não reduz hipernociceção mecânica induzida por prostaglandina. A hipernociceção foi mensurada antes e 3 h após injeção de PGE₂ (100 ng/i.pl) nas patas traseiras de ratos. Salina ou CboL (100 µg/i.t.) foram administradas i.t. 15 minutos antes da administração do estímulo. Os resultados são expressos com media ± E.P.M. da intensidade de hipernociceção (Δ limiar de estímulo, g) (n=5). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina (ANOVA, teste de Bonferroni).

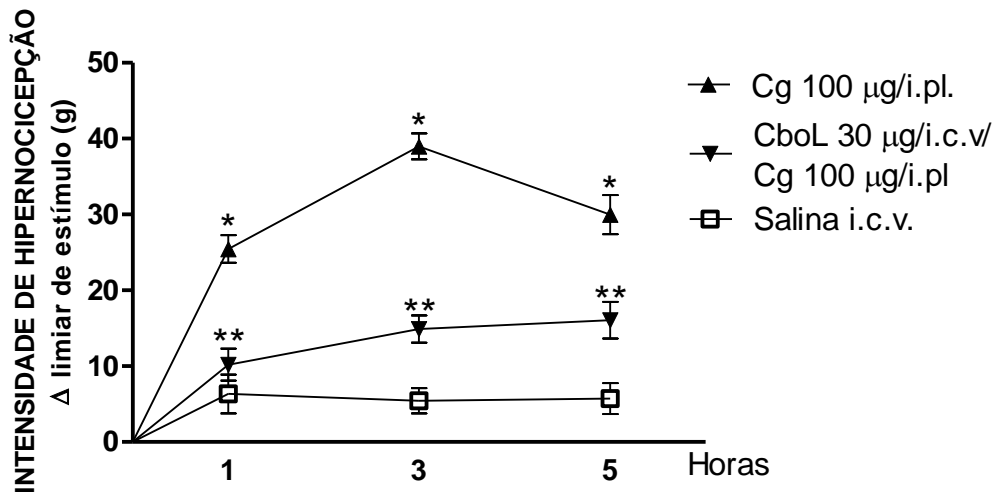


Figura 20 – Lectina de CboL administrada intra-cerebro-ventricular reduz hipernociceção mecânica induzida por carragenina. A hipernociceção foi mensurada de 0 a 5 horas após injeção de Cg (100 µg/i.pl) nas patas traseiras de ratos. Salina ou CboL (30 µg/cav) foram administradas i.c.v. 15 minutos antes da administração do estímulo. Os resultados são expressos com media ± E.P.M. da intensidade de hipernociceção (Δ limiar de estímulo, g) (n=5). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina; ** comparado ao grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).

a) Lectina de Canavalia boliviana administrada intra-cerebro-ventricular reduz migração de neutrófilos em hipernocicepção induzida por carragenina

A migração de neutrófilos foi mensurada através da dosagem de MPO no tecido da pata dos animais. A administração i.pl. de Cg (100 µg/0,1 mL) induziu intenso acúmulo de neutrófilos para o interior da pata dos animais. O pré-tratamento i.c.v. com CboL (30 µg/cav) 15 min antes da administração intraplantar de Cg reduziu de forma significativa o acúmulo de neutrófilos na pata dos animais (61 %, inibição) (Figura 22).

b) Efeito da administração intra-cerebro-ventricular da lectina de Canavalia boliviana sobre o limiar basal nociceptivo dos animais apresenta atividade anti-hipernociceptiva e demonstra envolvimento com sistema opióide.

No intuito de avaliar o efeito dose resposta da administração i.c.v. sobre o limiar basal nociceptivo, animais receberam salina e.v. (controle) ou CboL e.v. (10, 30 e 100 µg/cav). O pré-tratamento i.c.v. com CboL mostrou efeito anti-hipernociceptivo na medida mensurada 3 horas após a sua administração (Figura 21 A). Na modulação de CboL com naloxona, os animais que receberam CboL (30 µg/cav) i.c.v. após 15 min do pré-tratamento com naloxona (1 mg/Kg; s.c.) apresentaram seu efeito anti-hipernociceptivo abolido em relação ao animais que receberam apenas CboL (Figura 22 B).

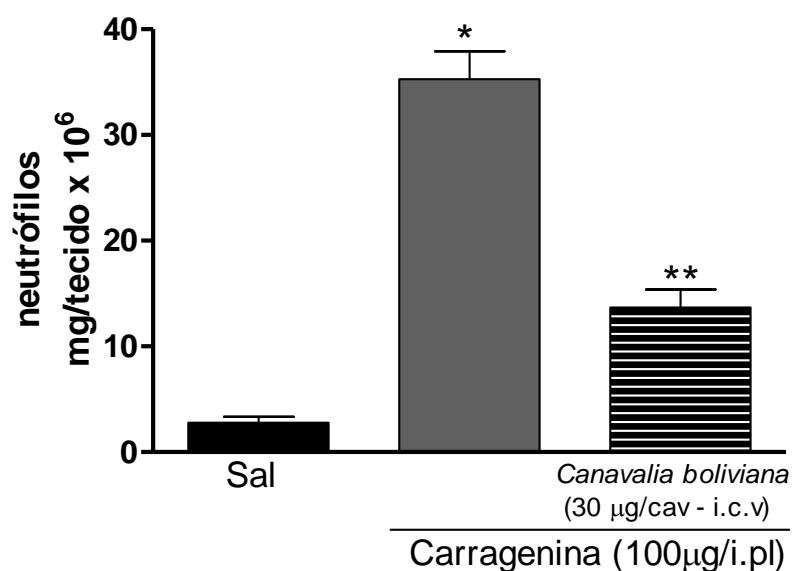


Figura 21 – Lectina de CboL administrada intra-cerebro-ventricular reduz o influxo de neutrófilos na pata de ratos estimulados com carragenina. Veículo (salina) ou CboL (30 µg/cav) foram injetados e.v., e 15 minutos depois, Cg i.pl. (100 µg/pata) foi administrado na pata traseira dos animais. O grupo controle negativo recebeu apenas salina. A atividade da mieloperoxidase na pata traseira foi usada como um indicador do influxo de neutrófilos. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. do nº de neutrófilos (n=6). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo salina, ** comparado ao grupo carragenina (ANOVA, teste de Bonferroni).

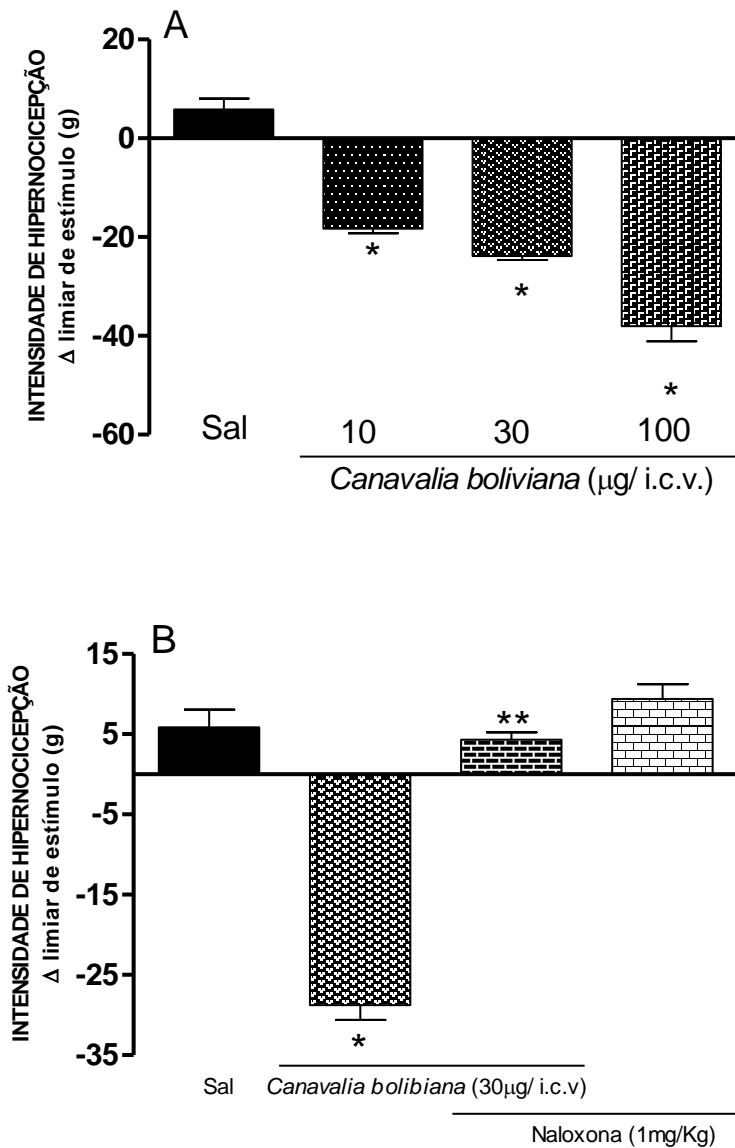


Figura 22 – Efeito da lectina de CboL administrada intra-cerebro-ventricular sobre o limiar basal e envolvimento do sistema opióide em modelo de hipernociceção mecânica. Painel A: Dose resposta da administração i.c.v. de salina e da CboL (10, 30 e 100 μ g) 15 minutos antes do início do teste. A hipernociceção foi mensurada 3 h após a administração de CboL ou salina. **Painel B:** Modulação por naloxona (1 mg/Kg; s.c.) administrada 15 minutos antes da administração i.c.v. de salina e CboL (30 μ g/cav.). Os resultados são expressos com media \pm E.P.M. da intensidade de hipernociceção (Δ limiar de estímulo, g) (n=5). * indica significância estatística (P<0.05) comparado ao grupo Salina. ** comparado ao grupo somente CboL (ANOVA, teste de Bonferroni).

4.2.6 A coordenação motora de camundongos não é afetada pela administração da lectina de *Canavalia boliviana*

Entre os grupos Salina e CboL (1, 5 e 10 mg/Kg) administrados e.v., em camundongos, 30 min antes de serem colocados na barra, não houve diferença estatística significativa. Somente o grupo administrado com diazepam (2 mg/Kg; i.p.) mostrou uma perda da coordenação motora significativa pelos animais nesse teste, quando comparados aos do grupo controle (Figura 23).

4.2.7 Lectina de *Canavalia boliviana* não modificou a locomoção espontânea de camundongos no teste de campo aberto

Entre os grupos Salina e CboL (1, 5 e 10 mg/Kg) administrados e.v., em camundongos, 30 min antes de serem colocados no campo aberto, não houve diferença estatística significativa. Somente o grupo administrado com diazepam (2 mg/Kg; i.p.) mostrou uma perda da atividade locomotora significativa pelos animais nesse teste, quando comparados aos do grupo controle. (Figura 24).

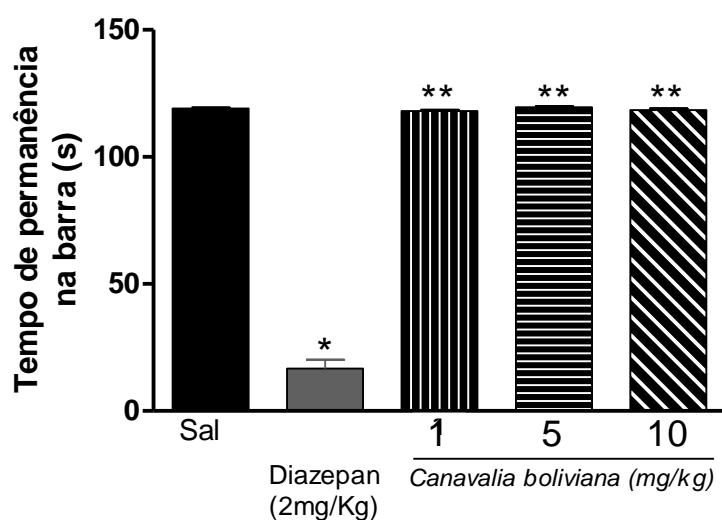


Figura 23 – A coordenação motora de camundongos não é afetada pela administração da CboL. Os animais receberam 30 min antes de serem colocados sobre a barra: salina (controle; e.v.), diazepam (2 mg/Kg; i.p.) ou CboL (1, 5 e 10 mg/Kg; e.v.), respectivamente. Os valores representam a média \pm E.P.M do tempo de permanência na barra em segundos (s) durante 2 minutos (n=6). * $p < 0,05$ indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo salina. **quando comparado ao grupo Diazepam. (ANOVA, teste de Bonferroni).

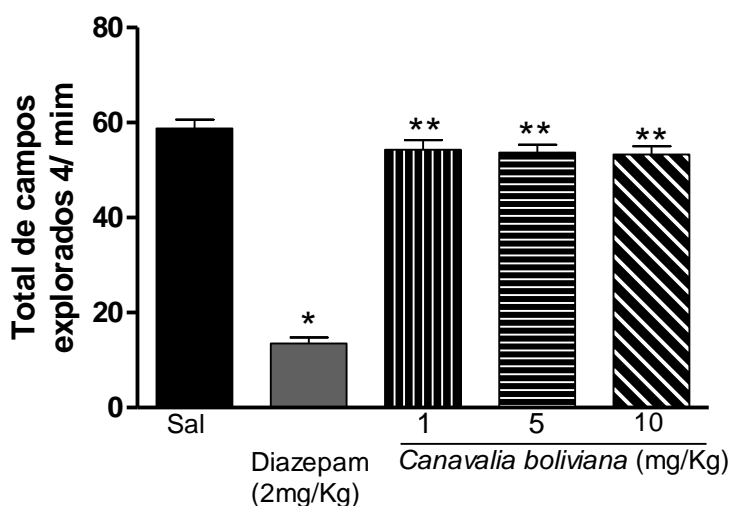


Figura 24 – A locomoção espontânea de camundongos não é afetada com a administração da lectina de CboL. Os animais receberam 30 min antes de serem colocados no campo aberto: salina (controle; e.v.), diazepam (2 mg/Kg; i.p.) ou CboL (1, 5 e 10 mg/Kg; e.v.), respectivamente. Os valores representam a média \pm E.P.M do total de campos explorados durante 4 minutos. * $p < 0,05$ indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo salina (n=6). **quando comparado ao grupo Diazepam (ANOVA, teste de Bonferroni).

4.3 EFEITOS DO TRATAMENTO SUBCRÔNICO COM LECTINA DE *Canavalia boliviana* EM CAMUNDONGOS

CboL (5 mg/Kg; e.v.) quando administrada em um esquema posológico de dose diária única durante quatorze dias consecutivos não afetou significativamente a massa corporal dos camundongos ou o peso úmido dos órgãos avaliados (fígado, rim e coração), comparados com os animais que receberam somente salina estéril no mesmo esquema posológico. Todos os órgãos avaliados demonstraram aparência normal e ausência de edema ao final do tratamento agudo com a lectina. Adicionalmente, a avaliação macroscópica do estômago demonstrou uma mucosa intacta e sem lesões visíveis em ambos os grupos avaliados (CboL ou Salina). Os valores de uréia e creatinina obtidos, usados como parâmetro para a avaliação da função renal não foram significativamente diferentes dos animais controle. Quando comparado com o controle (Salina) a função hepática avaliada pela cinética das enzimas hepáticas (alanina amino transferase-ALT e aspartato amino transferase-AST) e o número de leucócitos circulantes no sangue não foram alterados significativamente pelo tratamento com a lectina. A dose utilizada no tratamento agudo foi à mesma que demonstrou atividade antiinflamatória e antinociceptiva (Tabela 4).

| Parâmetros | Tratamento (0.1 mL; i.v.) | |
|--------------------------------------|---------------------------|----------------|
| | Salina | CboL (5 mg/Kg) |
| Massa corporal (g) antes | 29,10 ± 1,6 | 28,86 ± 1,8 |
| Massa corporal (g) depois | 33,73 ± 2,4 | 33,38 ± 3,3 |
| Fígado (g/20 g peso corporal) | 0,944 ± 0,2 | 1,046 ± 0,2 |
| Rim (g/20 g peso corporal) | 0,154 ± 0,02 | 0,148 ± 0,03 |
| Coração (g/20 g peso corporal) | 0,126 ± 0,03 | 0,113 ± 0,02 |
| Total leucócitos×10 ⁶ /ml | 7,086 ± 1,9 | 7,120 ± 2,3 |
| Neutrófilos×10 ⁶ /ml | 1,341 ± 5,2 | 1,212 ± 3,3 |
| Uréia (mg/dl) | 44,99 ± 3,7 | 47,95 ± 3,9 |
| Creatinina (mg/dl) | 0,259 ± 0,08 | 0,270 ± 0,04 |
| ALT (U/l) | 38,70 ± 4,0 | 51,42 ± 7,1 |
| AST (U/l) | 76,70 ± 9,4 | 78,17 ± 6,0 |

Tabela 4. Tratamento subcrônico dos camundongos com CboL. Os camundongos foram administrados com doses diárias únicas durante quatorze dias consecutivos. Após o período de tratamento, os animais foram pesados, amostras de sangue foram coletadas para avaliar o leucograma e dosagens bioquímicas, posteriormente os animais foram sacrificados e os órgãos ainda úmidos foram pesados. Os valores são apresentados como média ± E.P.M. (n=6) (Test Student)

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Apesar dos grandes avanços da ciência e pesquisa nos dias atuais, diversas doenças permanecem com sua etiologia desconhecida ou apresentam múltiplos fatores que contribuem para a permanência da doença no organismo. Algumas dessas patologias podem apresentar um caráter inflamatório e/ou doloroso, sendo tratados com a utilização de alguns medicamentos como os AINES, corticosteróides, opióides e derivados, na tentativa de aliviar a sintomatologia geral do doente (GUPTA e DUBOIS, 2002). Assim, a descoberta de novas substâncias com atividade antiinflamatória e/ou analgésica é ainda um aspecto altamente desejável e de enorme importância para a utilização clínica. Várias evidências demonstram que um grande número de medicamentos utilizados terapêuticamente é derivado direto ou indiretamente de produtos naturais, especialmente de plantas superiores, sendo estas uma fonte inesgotável de possibilidades para a descoberta de novos medicamentos (KOEHN e CARTER, 2005).

Nas últimas duas décadas, baseados em resultados obtidos com modelos experimentais de inflamação e nocicepção, nosso grupo de pesquisa têm sugerido o uso de lectinas como ferramentas biotecnológicas potentes a serem exploradas.

Neste estudo, demonstrou-se que a lectina isolada da sementes de *Canavalia boliviana* (CboL) atenuou a interação do leucócito-endotélio, a transmigração de neutrófilos, a nocicepção e também a hipernocicepção inflamatória em resposta a diferentes estímulos.

A carragenina é uma mistura de polissacarídeos derivados de algas marinhas, sendo um dos irritantes não-específicos mais amplamente utilizados para a indução e estudo da inflamação e para o desenvolvimento de drogas com ação antiinflamatória. Esta substância é caracterizada por elicitar a liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como aminas biogênicas na primeira fase, que são responsáveis pelo desenvolvimento dos eventos vasculares, que numa segunda fase é mantida por outros mediadores, tais como citocinas (IL-1 β e TNF- α) e prostaglandinas (DI ROSA *et al.*, 1970; MORRIS *et al.*, 2003).

Dessa maneira, delineamos investigar o efeito da CboL sobre a migração de neutrófilos induzida de forma indireta com o estímulo inflamatório carragenina, no modelo de peritonite em camundongos. Nossos resultados demonstraram que a

administração de CboL foi capaz de causar pronunciado efeito antiinflamatório na resposta celular induzida pela administração intraperitoneal de Cg através da diminuição do número de neutrófilos na cavidade peritoneal. Diversos trabalhos com lectinas de leguminosas têm demonstrado efeito antiinflamatório semelhante (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 2005; MOTA *et al.*, 2006; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006; NAPIMOGA *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2009). A carragenina induz aumento da permeabilidade vascular através de um exsudato contendo grande número de neutrófilos rico em proteínas (BASTOS *et al.*, 2001). Neste trabalho CboL reduziu significativamente o aumento da permeabilidade vascular induzido pela Cg sugerindo que CboL. Estes resultados demonstram o envolvimento da CboL em mecanismos envolvidos nos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória induzida pela administração da Cg.

Na fase inicial do processo inflamatório, os neutrófilos são reconhecidamente um dos principais componentes celulares presentes no sítio da inflamação. Estas células podem migrar para o sítio inflamado e liberar enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio, proteínas catiônicas e outros mediadores pró-inflamatórios (LAWRENCE *et al.*, 2002). A especificidade molecular dos leucócitos tendo como alvo os locais de inflamação é mediada pelas lectinas de membranas, selectinas, integrinas, e a superfamília de imunoglobulinas, que devido à correlação destas com os mecanismos de interação e adesividade entre diversas moléculas, leucócitos e células endoteliais, são conhecidas como moléculas de adesão. (SIMON e GREEN, 2005).

No local da inflamação a adesão ao endotélio é um pré-requisito para a infiltração dos neutrófilos. Selectinas medeiam este processo, que através de domínios lectínicos reconhecem e interagem de forma específica com carboidratos de superfície. Entre as moléculas envolvidas na adesão firme de neutrófilos estão integrinas CD11b/CD18 (nos neutrófilos) também denominado de LFA-1, que é uma integrina da classe $\beta 2$, expressa em todos os leucócitos (CARMAN *et al.*, 2003) ou ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais (HÉRBERT, 2000).

Após o estímulo induzido por citocinas pró-inflamatórias ou por ativação do fator de transcrição nuclear (NF-kappaB), as moléculas de adesão presentes nos leucócitos e nas células endoteliais adquirem alta afinidade pelo seu ligante (TURUTIN *et al.*, 2003). A partir deste evento, em conjunto com a liberação de

fatores quimiotáticos, ocorre a ligação firme entre os leucócitos e o endotélio, permitindo assim, a migração celular (TACHIMOTO *et al.*, 2002). Este é o papel das integrinas, pelo qual fazem a transmigração celular do sangue para os tecidos.

Nosso grupo de pesquisa, recentemente demonstrou a importância da interação leucócito-endotélio na atividade antiinflamatória da lectina isolada de sementes de *Lonchocarpus sericeus* e de *Canavalia grandiflora*. Estas proteínas foram hábeis em reduzir o rolamento e adesão dos leucócitos no endotélio vascular mesentérico de camundongos estimulados com Cg (NAPIMOGA *et al.*, 2007; e NUNES *et al.*, 2009). Outras lectinas também foram capazes de reduzir esta interação de leucócitos *in vitro* e *in vivo* (COELHO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006).

CboL em todas as doses mostrou-se eficaz em reduzir o rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio vascular em resposta a administração de Cg. Este resultado são consistentes para formulação da hipótese de que no modelo de peritonite induzida por Cg, um dos mecanismos para que CboL tenha inibido a transmigração celular para cavidade peritoneal seja via inibição da interação de moléculas de adesão/rolamento com leucócitos circulantes. Entretanto, a etapa bem como a/as moléculas de adesão envolvidas no efeito da CboL precisam ser elucidadas pois ainda não está claro a etapa que estas lectinas são capazes de inibir a interação moléculas de adesão ou rolamento x leucócitos.

O tráfego de leucócitos para os tecidos lesados é um processo complexo sequencial e coordenado aos quais citocinas estão envolvidas. Os leucócitos podem responder a TNF- α e IL-1 β ativando e expressando integrinas, produzindo fator ativador de plaquetas, e outros mediadores. Embora ambas as citocinas (TNF- α e IL-1 β) não sejam agentes quimiotáticos diretos, estas moléculas mobilizam selectinas de células endoteliais e produzem supra regulação “up regulation” das moléculas de adesão celular. Por outro lado, citocinas sinérgicas podem induzir a produção de quimiocinas, as quais podem contribuir para um aumento no rolamento, adesão e quimiotaxia de leucócitos (SMEETS *et al.*, 2005, FELDMANN e PUSEY, 2006).

Dados da literatura evidenciam que citocinas antiinflamatórias como a IL-10 são liberadas tardiamente no processo inflamatório produzidas em determinadas magnitudes em resposta ao agente agressor, limitando as conseqüências deletérias

causadas pela ação prolongada de citocinas pró-inflamatórias (VERRI *et al.*, 2006, ASSREUY 2002; ASSREUY 2003). A secreção de citocinas antiinflamatórias acontece somente após a secreção de citocinas pró-inflamatórias agindo assim como um regulador da inflamação.

Nosso estudo demonstrou que sistemicamente CboL reduziu as concentrações de TNF- α e IL1- β , e aumentou as concentrações de IL-10 através de estimulação induzida por Cg. Dessa forma, podemos sugerir que o efeito antiinflamatório da CboL no modelo de peritonite, parece estar diretamente relacionado à eventos ocorridos no foco inflamatório, considerando a sua capacidade de interferir na síntese/liberação de citocinas pró e antiinflamatórias por células residentes. Este mecanismo pode estar relacionado com a redução do influxo de neutrófilos para o sítio da injúria, uma vez que estes mediadores atuam expressando moléculas de adesão, aumentando a avidéz de ligação, ativando neutrófilos e promovendo quimiotaxia.

Dados na literatura demonstram a participação do óxido nítrico (NO) no processo inflamatório e nociceptivo. Estes estudos demonstraram que o NO também interfere com o recrutamento de neutrófilos podendo inibir ou induzir a migração dessas células (IALENTI *et al.*, 2000; PAUL-CLARK *et al.*, 2001; MCCARTNEY-FRANCIS *et al.*, 2001). KUBES e colaboradores (1991) demonstraram em seus resultados, que o NO pode ser um importante inibidor endógeno de adesão leucocitária em vênulas pós-capilares, pois a inativação do NO pela produção identificada de O₂⁻ pelas células endoteliais e/ou neutrófilos pôde contribuir com a aderência leucocitária.

Em se tratando de produção de NO induzido por lectinas de leguminosas está bem demonstrado a capacidade das lectinas isoladas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora*, *Pisum arvense*, *Concanavalina A*, *Dioclea rostrata* e *Lonchocarpus sericius* induzirem a produção de NO *in vitro* e *in vivo* (ANDRADE *et al* 1999; NAPIMOGA *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Em outro estudo realizado *in vitro* demonstrou-se que macrófagos murinos quando isolados do peritônio, e tratados com a lectina de *Concanavalina A*, foram capazes de induzir um aumento na produção de NO e na expressão de NOS_i por diferentes ligantes aos receptores Toll-like (SODHI *et al.*, 2007). Também foi reportado a capacidade da lectina de *Concanavalina A* e a fitohemaglutinina, *in vitro*, em induzir a produção de

NO e a expressão de iNOS em macrófagos murinos. (KESHERWANI e SODHI, 2007).

Considerando os resultados descritos que demonstram a capacidade de lectinas em induzir aumento na produção de NO nosso próximo passo foi verificar se o tratamento e.v. com a CboL acarretaria em modificações nos níveis sanguíneos de NO. Como resultado, demonstrou-se que a CboL foi ineficaz em aumentar a produção de NO (via aumento dos níveis de nitrito) no soro dos animais submetidos à peritonite induzida por Cg. Sugerindo que provavelmente o óxido nítrico não esteja envolvido no efeito antiinflamatório promovido pela CboL para o sítio da injúria.

Neste estudo investigamos o papel do sítio de ligação da CboL ao seu ligante específico (D-Glicose), no seu efeito sobre a migração de neutrófilos no modelo de peritonite induzido por Cg. Os resultados demonstram que quando a CboL foi administrada associada a D-Glicose, seu efeito antiinflamatório foi totalmente revertido. Estes dados sugerem a hipótese do envolvimento do sítio ligante (a D-Glicose) da CboL no seu efeito sobre a migração de neutrófilos. Corroborando com esta especulação, estão as demonstrações da importância do sítio ligante à carboidratos de outras lectinas para a elicitação de seus efeitos biológicos, quer sejam pró- ou antiinflamatórios (ALENCAR *et al.*, 1999; 2005a; 2005b; 2005c; FREIRE *et al.*, 2003; MOTA *et al.*, 2006; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

Dados da literatura demonstram que lectinas com grande homologia em relação à estrutura primária, apresentam significativas diferenças em seus efeitos biológicos, sugerindo que algum tipo de diferença estrutural entre estas proteínas podem ocasionar diferenças de afinidade em cada complexo estabelecido entre lectina-ligante (RAMOS *et al.*, 1996; BRINDA *et al.*, 2005). A interação de lectinas com estruturas glicanas complexas presentes em glicoproteínas ao sítio de reconhecimento a monossacarídeos tem um papel chave na ligação destas estruturas. Uma única unidade de monossacarídeo é reconhecida pelo sítio de ligação da lectina, enquanto que outras interações não covalentes são estabelecidas (interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, mediadas por moléculas de água) e desta forma estabilizam o complexo lectina-ligante (BOURNE *et al.*, 1992).

Desta forma, investigou-se a importância da estrutura tridimensional da CboL na efetivação de seus efeitos antiinflamatórios. Sua estrutura terciária foi alterada

através de desnaturação térmica. Observou-se que a desnaturação da proteína reverteu completamente o seu efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos no modelo de peritonite. Esses achados corroboram com a literatura, onde se demonstra a importância da integridade da estrutura tridimensional de lectinas em suas atividades pró- ou antiinflamatória (ALENCAR *et al.*, 2003; ALENCAR *et al.*, 2004; BITENCOURT *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

Após verificarmos o efeito da CboL em modelo experimental de inflamação inata, induzida por agente inespecífico (Cg), decidemos investigar o efeito da lectina em modelos experimentais de inflamação imune. Para tanto, utilizamos o modelo experimental de inflamação induzida pela administração de ovalbumina (OVA) em animais pré-imunizados. A OVA é uma proteína bastante utilizada como antígeno em protocolos de imunização, geralmente na forma de antígeno solúvel associado ao adjuvante de Freund. A utilização de antígenos em emulsão água-óleo estimula a produção de anticorpos em grande quantidade por um longo período de tempo, sendo este efeito atribuído à lenta liberação do antígeno. Além disso, a utilização do adjuvante completo de Freund, contendo *Micobactéria tuberculosis* é utilizada para dirigir a resposta imune para um padrão Th1 após o desafio com OVA, podendo-se observar alta predominância de neutrófilos na fase aguda do processo (BILLIAU e MATTHYS, 2001). Cinéticas de infiltração celular induzida por desafio antigênico em animais imunizados com OVA já foram demonstradas em camundongos onde se observou um significativo infiltrado de eosinófilos e células mononucleares (CANETTI *et al.*, 2001). Neste sentido, CboL demonstrou-se eficaz em inibir a migração de neutrófilos em animais previamente imunizados e desafiados com OVA. Estes resultados nos mostram que a lectina modula negativamente a migração celular frente a diferentes agentes inflamatórios.

O processo de quimiotaxia de neutrófilos frente a um estímulo quimiotático envolve mecanismos unificados, incluindo a ativação de receptores acoplados a proteína G, mecanismos de sinalização intracelular, polimerização de actina, a reorganização do citoesqueleto, o desenvolvimento de polaridade e a adesão reversível (WALLACE e WERSTO *et al.*, 1984; SHIELDS e HASTON, 1985). Fatores quimiotáticos podem ser produzidos por uma ampla variedade de células, incluindo células endoteliais e epiteliais, macrófagos, monócitos, linfócitos e plaquetas, os próprios neutrófilos e células parenquimais (VICENTE-MANZANARES, 2004). Após

verificarmos *in vivo* a inibição da migração de neutrófilos pela CboL, nosso próximo passo foi investigar se CboL apresentaria efeito direto sobre os neutrófilos, para isto utilizamos como ferramenta o ensaio de quimiotaxia de neutrófilos frente a quimiocina MIP-2 *in vitro* em camara de boyden observamos que a lectina foi eficiente em inibir a migração de neutrófilos isolados do sangue de camundongos e estimulados com MIP-2, sugerindo assim, que esta lectina além de interferir indiretamente com a migração de neutrófilos via controle da liberação de citocinas pró- e antiinflamatórias, atua diretamente no neutrófilo inibindo sua a migração.

O conjunto de resultados obtidos até esta etapa deram suporte para a formulação das seguintes hipóteses: 1) a lectina estaria inibindo a concentração de citocinas (IL-1 β e TNF- α) e aumentando a concentração (IL-10) desta forma reduzindo a migração e quimiotaxia de neutrófilos; e/ou 2) a lectina age diretamente sobre as moléculas de interação leucócito/endotélio bloqueando o sítio de ligação e conseqüentemente reduzindo o rolamento/adesão.

O interesse em identificar novos alvos para o tratamento da dor tem aumentado expressivamente nos últimos anos. Apesar dos avanços recentes ocorridos na compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese e manutenção da dor, as terapias disponíveis atualmente possuem apenas resultados parciais e a maior parte das drogas analgésicas apresenta importantes efeitos colaterais, o que dificulta o uso contínuo. Diante deste contexto, vários modelos de nocicepção em animais de laboratório têm sido propostos, a fim de avaliar a ação antinociceptiva de várias drogas. No entanto, de maneira geral, esses modelos possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como sua simplicidade, reprodutibilidade e validade dos resultados obtidos e principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos (WALKER *et al.*, 1999).

Entre os modelos de nocicepção utilizados neste trabalho, o teste das contorções abdominais, induzidas pelo ácido acético, é descrito como um típico modelo para avaliar a dor de origem inflamatória, pouco específico, mas com boa sensibilidade, sendo uma ferramenta de triagem para avaliação da atividade analgésica e antiinflamatória de novos agentes (IKEDA *et al.*, 2001; LE BARS *et al.*, 2001). Neste modelo, a administração de um agente irritante para a membrana serosa, como ácido acético, provoca comportamentos estereotipados em camundongos, que são caracterizados por contorções abdominais que são

considerados reflexos e evidenciam a dor visceral (LE BARS *et al.*, 2001). Em termos de mecanismo os prótons oriundos da dissociação do ácido acético podem ativar diretamente canais de cátion não seletivos localizados nas fibras aferentes primárias (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Através da realização deste teste, foi possível observar que a administração sistêmica, de CboL reverteu o número de contorções abdominais produzidas pela injeção i.p. de ácido acético em camundongos. A irritação local, provocada pela administração deste agente na cavidade intraperitoneal desencadeia a liberação de vários mediadores como prostaglandina, histamina, bradicinina, serotonina, substância P, bem como algumas citocinas como IL-1 β , TNF α e IL-8 entre outros (RIBEIRO *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001). Dessa forma, o resultado obtido neste trabalho sugere que o efeito antinociceptivo da CboL pode estar relacionado à inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios, induzida pelo ácido acético e mais ainda pela inibição da migração de células que exacerbariam o processo doloroso. Contudo, como já mencionado o teste de contorções abdominais é inespecífico, já que analgésicos opióides, antidepressivos tricíclicos e drogas AINEs podem inibir a resposta nociceptiva no modelo do ácido acético (FRANÇA *et al.*, 2001; DAÍ *et al.*, 2002, GARCIA *et al.*, 2004).

O próximo passo foi avaliar o teste da formalina, o qual é um modelo de dor aguda e tônica (TRONGSAKUL *et al.*, 2003). Este modelo consiste na injeção intraplantar ou subcutânea de formalina. A resposta provocada pela formalina constitui-se duas fases de nocicepção: A primeira fase (dor neurogênica) resulta da estimulação química direta das fibras aferentes nociceptivas mielinizadas e não-mielinizadas (fibras C); enquanto que a segunda fase (dor inflamatória) resulta da ação de mediadores inflamatórios liberados no tecido periférico e de mudanças funcionais nos neurônios do corno dorsal espinhal que permitem, em longo prazo, a facilitação da transmissão sináptica a nível espinhal (FRANÇA *et al.*, 2001; CAMPOS *et al.*, 2002; DAÍ *et al.*, 2002).

Na literatura a grande maioria das lectinas que relatam o efeito antinociceptivo demonstram este efeito periféricamente (2ª fase, dor inflamatória), (BITENCOURT *et al.*, 2008; NAPIMOGA *et al.*, 2007). Entretanto no presente estudo a atividade da CboL foi observada também na primeira fase (dor neurogênica) do teste da formalina quando comparadas a morfina um agonista opióide utilizado como padrão.

Adicionalmente CboL também demonstrou um significativo efeito na segunda fase da formalina. Esses resultados sugerem além de uma possível resposta de ação central, também, uma resposta na nocicepção de cunho inflamatório, e esta ação pode estar relacionada com a síntese e/ou ação destes mediadores nociceptivos e inflamatórios; isso corrobora com os resultados dos experimentos de inflamação no qual a lectina então estaria inibindo a migração de células ao local injuriado e conseqüentemente, inibindo a transdução da dor.

É importante ressaltar que o efeito antinociceptivo da CboL na primeira fase foi dose-dependente (10 mg/kg foi a maior dose) e na segunda fase este efeito se apresentou de maneira de uma curva de sino (“bell-shaped”) (1 mg/kg apresentou maior efeito antiinflamatório). Este efeito pode refletir que doses diferentes da mesma droga possam ter ações diferentes e opostas ou atividade agonista parcial sobre seus receptores (KEKESI *et al.*, 2004).

Para verificar o envolvimento do sistema central no efeito antinociceptivo da CboL foi realizado o teste da placa quente, este teste indica a resposta ao estímulo térmico que é associado à neurotransmissão central (HUNSKAAR *et al.*, 1996). O comportamento do animal de “sapatear” ou lambe as patas é a indicação da resposta ao estímulo nociceptivo térmico, enquanto que a latência para o aparecimento desta resposta é cronometrada em segundos. ANKIER (1974), avaliando analgésicos análogos a morfina em camundongos, demonstrou que a placa quente a 55 °C produzia resultados falsos negativos e sugeriu o uso de temperaturas inferiores (em torno de 51 °C). Por este motivo neste trabalho utilizamos a placa quente temperatura $51 \pm 0,5$ °C.

CboL em todas as doses testadas demonstrou influência significativa no tempo de permanência do animal sob o estímulo térmico, desta forma aumentou o tempo de reação dos animais nos tempos de 30, 60, 90, 120 minutos, tendo seu platô de resposta 60 minutos após o tratamento sistêmico de CboL 10 mg/Kg. Morfina utilizada como padrão aumentou significativamente o tempo de reação na placa quente (30, 60 e 90 minutos). Estes resultados reforçam os já demonstrados no teste da formalina e sugerem que o efeito antinociceptivo da CboL envolve um mecanismo de ação central. Recentes trabalhos têm demonstrado efeito analgésico de lectinas de algas tanto a nível central quanto periférico. NEVES e colaboradores (2007) demonstraram esses efeitos para a lectina de alga marinha *Amansia multifida*

Lamouroux. Porém dados de envolvimento em nível de ação central de lectinas de leguminosas ainda não havia sido reportado na literatura.

Atualmente, os opióides constituem uma das mais usadas e efetivas classes de drogas empregadas no tratamento de dores moderadas e severas de diferentes origens, incluindo-se dores pós-operatórias e também as de origem inflamatória (GUTSTEIN e AKIL, 2001). O papel dos receptores opióides na modulação da nocicepção está bem demonstrado na literatura (SAKURADA *et al.*, 2005). A ação analgésica central é confirmada pelo efeito inibitório da naloxona, um antagonista específico dos receptores morfinomiméticos (MUNDEY *et al.*, 2000). O pré-tratamento com naloxona dos camundongos tratados com morfina e CboL bloqueou o efeito antinociceptivo da morfina assim como da CboL. Isto pode sugerir o envolvimento do sistema opióide na modulação da dor por CboL, e este envolvimento é importante pois a ativação destes receptores é efetiva em reduzir a nocicepção induzida nos diferentes modelos conhecidos (WALKER, 1999; LE BARS *et al.*, 2001). Além disso, os receptores opióides (μ , κ e δ) estão localizados em vários níveis da transmissão da dor (FÜRST, 1999), sendo responsáveis pelas ações antinociceptivas diretas e indiretas dos agonistas opióides (HUI *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2003)

Além disso, nós avaliamos o efeito antinociceptivo da CboL em outro modelo de nocicepção, visto que é importante testar o efeito de uma substância com potencial terapêutico em diferentes modelos experimentais. Deste modo o próximo passo foi investigar a atividade antinociceptiva da CboL na hipernocicepção de origem inflamatória.

A lectina de CboL foi capaz de inibir a hipernocicepção induzida pela Cg nos tempos de 1, 3, 5 e 7 horas após a administração da Cg, esta atividade parece compartilhar do mesmo mecanismo da atividade antiinflamatória, uma vez que neste modelo de hipernocicepção, CboL foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos para a pata de ratos administrados com carragenina sendo mensurada através da atividade da mieloperoxidase. A mieloperoxidase, quando liberada, participa da indução do metabolismo respiratório, evento este importante na fagocitose de microorganismos invasores, como por exemplo: bactérias, vírus e fungos, bem como células tumorais. Durante a ativação dos neutrófilos esta enzima é liberada dos fagossomos para o espaço extracelular, onde irá reagir com o peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), que é derivado do metabolismo respiratório dos neutrófilos, catalisando então a formação de potentes agentes microbicidas como ácido hipocloroso (HOCl) e outras espécies oxidativas (WINTERBOURN *et al.*, 2000). Dados semelhantes com outras lectinas de leguminosas foram reportados (NAPIMOGA *et al.*, 2007 e NUNES *et al.*, 2009).

Sob as condições experimentais utilizadas no presente estudo, já está bem demonstrado que Cg induz hipernocicepção mecânica em ratos, ativando uma cascata seqüencial de citocinas. Esta cascata, em geral, começa com TNF- α , que estimula duas vias distintas: a IL-1 β que por sua vez ativa ciclooxigenase para produzir prostanóides e b) produção de CXCL1/CINC-1, que estimula a liberação de aminas simpáticas (VERRI *et al.*, 2006). Os Prostanóides e aminas simpáticas também estão envolvidos e são responsáveis pela sensibilização do nociceptor (CUNHA *et al.*, 2005). Assim, drogas que inibem a produção de citocinas, tais como corticosteróides, talidomida (RIBEIRO *et al.*, 2000), pentoxifilina (VALE *et al.*, 2004) e produtos naturais (VALÉRIO *et al.*, 2007) são analgésicos em modelos de inflamação.

Após um estímulo nocivo, vários tipos celulares presentes no tecido produzem e/ou liberam citocinas pró-inflamatórias. A citocina IL-1 β pode ser produzida por células dendríticas, melanócitos, fibroblastos ou leucócitos em condições patológicas associadas a neuropatias, crescimento tumoral e doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide (GRONE *et al.*, 2002). O TNF- α é considerado uma citocina inflamatória primária devido a seu papel de iniciar a ativação de outras citocinas, sendo que o ponto final da cascata resulta na ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2) (SOMMER e KRESS, 2004). Levando em conta esta evidência, o próximo passo foi verificar se o efeito antinociceptivo da CboL era dependente da inibição ou produção de citocinas. Para isto foi realizada a dosagem das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10, onde verificou-se neste estudo que o efeito antinociceptivo da CboL não está associado à inibição local (na pata) de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e produção de citocinas antiinflamatórias (IL-10). Contudo não podemos descartar o efeito sistêmico da CboL sobre a produção da IL-10 e também o efeito inibitório desta lectina sobre as citocinas IL-1 α e TNF- α na atividade antihipernociceptiva.

Um grande número de estudos *in vivo* têm mostrado que perifericamente injetado PGE₂ produz hiperalgesia e alodinia tanto em animais experimentais como

em seres humanos (FERREIRA, 1972; KUHN e WILLIS, 1973). Atualmente, sabe-se que após uma injúria tecidual ou inflamação, os neurônios aferentes primários nociceptivos (nociceptores) são sensibilizados de tal maneira que estímulos mecânicos, térmicos ou mesmo químicos, normalmente inócuos, tornam-se dolorosos. Na verdade, PGE₂ age diretamente sobre os receptores presentes nas membranas nociceptores, provocando a sua sensibilização (CUNHA, 1992). Prostaglandinas tornaram-se as moléculas mais estudadas no contexto da dor inflamatória. As prostaglandinas são consideradas mediadores inflamatórios finais da sensibilização dos nociceptores, ou mesmo, como mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos de ação direta. Portanto a hipernocicepção produzida por PGE₂ é independente da produção de outros mediadores ou células inflamatórias, como neutrófilos (CUNHA *et al.*, 2008a, 2008b).

Neste trabalho CboL também inibiu a hipernocicepção induzida por PGE₂ em sua atividade máxima (3^a hora), demonstrando que CboL reduz diretamente a sensibilização do nociceptor, ou mesmo que CboL pode induzir um mediador endógeno. É importante mencionar que os analgésicos que agem por inibição da COX (isto é, AINEs) a produção de citocinas ou a migração de neutrófilos não são capazes de afetar a hipernocicepção induzida por PGE₂ (CUNHA *et al.* 2008b, RIBEIRO *et al.*, 2000). Nosso estudo indica claramente que as ações anti-hipernociceptivas da CboL parecem ter interação com o sistema opióide tendo em vista que o tratamento prévio dos animais com naloxona causou reversão do efeito anti-hipernociceptivo pela CboL.

Existe a possibilidade da resposta induzida pelo desafio com OVA se tratar de uma reação desencadeada por anticorpos, o que, com algumas diferenças, seria comum às reações de hipersensibilidade do tipo I, II e III. Resumidamente, a hipersensibilidade do tipo I é caracterizada por uma resposta mediada por IgE e ativação de mastócitos. A hipersensibilidade do tipo II é mediada por anticorpos IgM e IgG contra antígenos de superfície, opsonização e fagocitose de células. Na hipersensibilidade tipo III, anticorpos IgM e IgG formam imuno-complexos, ocasionando a migração de leucócitos pela ativação de complemento e receptores Fc (ABBAS e LICHTMAN, 2003). No entanto, existem evidências de que no modelo de imunização e desafio com OVA ocorre uma resposta de hipersensibilidade tardia

do tipo IV. Como a própria classificação indica, esta é uma resposta tardia. Contudo, é caracterizada pelo influxo de neutrófilos em sua fase inicial (CANETI *et al.*, 2001).

Em nosso estudo foi realizada a abordagem da hipernocicepção induzida por OVA em que a administração de CboL reduziu significativamente a hipernocicepção induzida pela OVA nos tempos de 1, 3, 5 e 7 horas. Este efeito provavelmente se deve a redução notável na migração de neutrófilos. OVA induziu um aumento da atividade da MPO como já mencionado neste trabalho e é um importante indicativo da progressão do processo inflamatório. CboL mostrou-se efetiva em reduzir a atividade da MPO induzida por OVA.

No intuito de verificar o efeito sobre o limiar basal dos animais no modelo de hipernocicepção utilizando morfina como controle, foi observado que a lectina foi hábil em apresentar tal efeito com resultados maiores que o controle no modelo de hipernocicepção. Podemos assim sugerir que este fato se deve provavelmente ao efeito analgésico da lectina.

Muitas pesquisas já foram e ainda estão sendo desenvolvidas a respeito das propriedades das lectinas no tocante dos mais diversos tipos de atividade biológica, porém poucas são aquelas que exploram seus efeitos no sistema nervoso central. Dados da literatura demonstram que a lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) (BARAUNA *et al.*, 2006) administrada i.c.v. em camundongos diminuiu o tempo de imobilidade dos animais tratados no teste do nado forçado sem alterar a atividade locomotora no teste do campo aberto, estes estudos apontaram a lectina ConBr como uma possível ferramenta no estudo dos sistemas de neurotransmissores envolvidos na depressão e também na caracterização/isolamento de alvos moleculares importantes na modulação do comportamento depressivo.

Neste estudo os resultados sugerem que o efeito antinociceptivo envolve o mecanismo de ação central via receptores opióides. Deste modo, no sentido de validar esta hipótese avaliamos o efeito antinociceptivo da CboL por outras vias de administração. Dados disponíveis na literatura demonstram que através da administração intratecal de analgésicos, atingindo a medula espinal há a produção de analgesia potencializada (MILLAN, 2002). CboL quando administrada por via intratecal não demonstrou nenhuma alteração significativa na redução da hipernocicepção mecânica induzida por PGE₂. A administração de drogas por via intratecal visa a verificação de efeitos sobre os neurônios da medula espinal,

considerados pertencentes ao sistema nervoso central. Porém, drogas injetadas por essa via penetram no espaço subaracnóide e a possibilidade de exercerem efeitos em outras estruturas presentes neste espaço, envolvidas pela membrana aracnóide, como as raízes aferentes e os gânglios da raiz dorsal (GRDs), não pode ser descartada. Considerando que substâncias administradas por via i.t. atingem os GRDs além de neurônios medulares, não permitindo a distinção entre a ação de drogas sobre neurônios primários e secundários (apud FERRARI, 2004). Uma hipótese para que a administração i.t. de CboL não tenha sido eficaz possa ser um efeito supra espinhal da lectina ou outra hipótese seria que CboL não tenha efeito diretamente sobre receptores opióides e sim ativando vias descendentes do controle da dor que dependem de opióides.

Dando sequência a investigação de outras vias para a avaliação da CboL no modelo de hipernocicepção CboL quando administrada i.c.v. mostrou-se eficaz reduzindo além da hipernocicepção o influxo de neutrófilos induzido pelo estímulo no caso carragenina, confirmando o possível mecanismo central e periférico de ação da lectina. A confirmação do envolvimento dos receptores opióides foi efetuada através da lectina administrada i.c.v. com a modulação por naloxona (s.c.), como já mencionado neste trabalho um potente antagonista dos receptores opióides. A Naloxona reverteu o efeito antihipernociceptivo da lectina quando administrada i.c.v.

Drogas com ação depressora sobre o sistema nervoso central e o efeito musculo relaxante não específico, podem reduzir a coordenação motora de animais (SOJA *et al.*, 2002). Para verificar a possibilidade de que a inibição do comportamento nociceptivo promovido pela CboL possa estar ocorrendo por um efeito sobre o sistema motor dos animais foram realizados testes de incoordenação motora e atividade locomotora. Os resultados demonstraram que CboL não causou qualquer alteração significativa da coordenação motora dos animais no teste do rota rod nas mesmas doses utilizadas nas quais apresentou efeito antinocicepção.

Como a dor produz diferentes reações autonômicas e comportamentais, dependendo da sua localização, o teste de campo aberto permite uma fácil observação destas condições (CAVUN *et al.*, 2004). Impedimentos locomotores relacionados à administração de substâncias algogênicas refletem o estado de imobilidade prolongada “freezing” dos animais entre os episódios comportamentais de dor. Os resultados obtidos no teste do campo aberto mostram que a atividade

antinociceptiva causada pela administração de CboL sistemicamente, não parece secundária a efeitos depressores e/ou inespecíficos do sistema nervoso central, tendo em vista que CboL foi efetiva, nos outros modelos de dor analisados no decorrer deste trabalho. A lectina foi destituída de ações incapacitantes ou mesmo depressora da atividade locomotora do animal, uma vez que estes são detectáveis pelo teste do campo aberto. Diazepam, um conhecido relaxante muscular, reduziu significativamente a locomoção dos animais.

Adicionalmente, CboL parece ser bem tolerada por esses animais, pois a avaliação da toxicidade sub-crônica em camundongos administrados sistemicamente em dose única durante quatorze dias não provocou nenhuma alteração morfológica nos órgãos avaliados (rim, fígado, coração e estômago). Os parâmetros usados na avaliação da função renal e hepática também não foram alterados quando comparado ao grupo controle (salina). O número de leucócitos circulantes no sangue e a massa corporal dos animais mantiveram-se normais depois do tratamento subcrônico com a lectina. Da mesma forma, MOTA e colaboradores (2006), NAPIMOGA e colaboradores (2007) e BITENCOURT e colaboradores (2008) mostraram para as lectinas de *Araucaria augustifolia*, *Lonchocarpus sericeus*, *Hypnea cervicornis*, respectivamente.

Sob o aspecto da grande importância em se buscar na natureza moléculas com potencial terapêutico para resolução/cura de processos patológicos, a lectina isolada das sementes de *Canavalia boliviana*, apresenta-se extremamente útil como uma ferramenta potente a ser explorada e uma possível utilização na elaboração de drogas que possam ser usadas no tratamento da inflamação e da dor.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Dados obtidos neste trabalho nos levam as seguintes conclusões:

- A lectina de *Canavalia boliviana* (CboL) nas doses utilizadas neste trabalho foi capaz de inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal tanto por um quanto por um indireto (Cg), quanto por um estímulo antigênico (OVA), demonstrando atividade antiinflamatória;
- O envolvimento da estrutura terciária da CboL é relevante para suas atividades biológicas e parece exercer sua ação antiinflamatória via interação do domínio lectínico;
- CboL foi hábil e reduzir a permeabilidade vascular induzida por Cg;
- A lectina diminui o rolamento e adesão de leucócitos em vênulas mesentéricas;
- A atividade antinflamatória demonstrada pela lectina não demonstra envolvimento com NO;
- A síntese e/ou liberação de citocinas (IL-1 e TNF- α) e aumento (IL-10) estão envolvidas no processo antiinflamatório;
- CboL demonstrou possuir atuação direta sobre neutrófilos;
- A lectina apresentou atividade antinociceptiva no modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético,
- A atividade antinociceptiva da CboL no modelo de formalina ocorreu na primeira e segunda fase, sugerindo ação na dor neurogênica e também na dor inflamatória.
- A CboL apresentou efeito antinociceptivo central no modelo da placa quente, corroborando assim com sua atividade central e periférica, sendo confirmado pela reversão com naloxona;
- CboL mostrou-se eficaz em inibir a hipernocicepção mecânica (Von Frey) induzida por carragenina e prostaglandina E₂, e por ovoalbumina em animais imunizados, reduzindo também o influxo de neutrófilos para a pata dos animais, excluindo a ação da concentração de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-10) na pata dos animais estimulados com carragenina

- CboL apresentou atividade anti-hipernociceptiva da CboL através da via intra-cerebro-ventricular, confirmando efeito central e o envolvimento de receptores opióides;
- A atividade motora e locomotora dos animais não é alterada pela administração da lectina;
- De forma subcrônica CboL não altera o leucograma após sua administração;
- Quando administrada de forma subcrônica durante quatorze dias não promove alterações hepáticas e renais, nem no perfil leucocitário sanguíneo e no peso corporal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Cytokines, in Cellular and Molecular. In: _____ **Immunology**. (MALLEY, J.; KREHLING, H.; GRIGG, L.L.; HARRIS, G.) 243-273, Saunders. 2003.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **Journal Biochemistry**. 357: 593-615, 2001.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; DE MOURA, T.R.; DE SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S.; *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's of Archives Pharmacology**. 374: 275-282, 2007.

ALENCAR, N.M.N.; CAVALCANTE, C.F.; VASCONCELOS, M.P.; LEITE, K.B.; ARAGÃO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; CAVADA, B.S.; VALE, M.R. Anti-inflammatory and anti-microbial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 57: 919-922, 2005.

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

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. **The International Journal Biochemistry Cell Biology**. 35: 1674-1681, 2003.

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

ALENCAR, V.B.M.; ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; MOTA, M.L.; BRITO, G.A.C.; ARAGÃO, K.S.; BITENCOURT, F.S.; PINTO, V.P.T.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **The International Journal Biochemistry Cell Biology**. 37: 1805-1814, 2005a.

ALENCAR, V.B.M.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, N.M.N.; MEIRELES, A.V.P.; MOTA, M.R.L.; ARAGÃO, K.S.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C S.; BRITO, G A C; SILVA, L I M M; PINTO, V P T; SAMPAIO, A H; DEBRAY, H; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces *in vivo* and *in vitro* neutrophil migration. **The Journal of pharmacy and pharmacology**. 57: 375-381, 2005b.

ALENCAR, V.B.M.; BRITO, G.A.C.; ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; PINTO, V.P.T.; TEIXEIRA, E.H.; SOUZA, E.P.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. *Helianthus tuberosus* agglutinin directly induces neutrophil migration, which can be modulated/inhibited by resident mast cells. **Biochemistry and Cell Biology**. 83: 659-666, 2005c.

ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R.M.; SNYDERMAN, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **The Medical Clinics of North America**. 81: 1-28, 1997.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**. 1000: 40-56, 2004.

ANDRADE, C.A.; CORREIA, M.T.; COELHO, L.C.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. 8: 435-445, 2004.

ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B. S.; BARRAL-NETTO, M., Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**. 194: 98-102, 1999.

ANKIER, S.J. New hot plate tests to qualify antinociceptive and narcotic antagonists activities. **European Journal of Pharmacology**. 27: 1-4, 1974.

ASSREUY, A.M.S.; FONTENELE, S.R.; PIRES, A.F.; FERNANDES, D.C.; RODRIGUES, N.V.F.C.; BEZERRA, E.H.S.; MOURA, T.R.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 380: 509-521, 2009.

ASSREUY, A.M.; ALENCAR, N.M.; CAVADA, B.S.; ROCHA-FILHO, D.R.; FEITOSA, R.F.; CUNHA, F.Q.; CALVETE, J.J.; RIBEIRO, R.A. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. **Biology of Reproduction**. 68: 1836-1841, 2003.

ASSREUY, A.M.; CALVETE, J.J.; ALENCAR, N.M.; CAVADA, B.S.; ROCHA-FILHO, D.R.; MELO, S.C.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. **Biology of Reproduction**. 67: 1796-1803, 2002.

ASSREUY, A.M.S.; MARTINS, G.J.; MOREIRA, E.E.F.; BRITO, G.A.C.; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; Prevention of Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **The Journal of Urology**. 161: 1988-1993, 1999.

ASSREUY, A.M.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; DE SOUZA, M.L.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation** 6: 201-210, 1997.

BAEZ, S. Simultaneous measurements of radi and wall thickness of microvessels in the anesthetized rat. **Circulation Research**. 25: 315-329, 1969.

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

BASBAUM, A.I.; JESSELL, T.M. A percepção da dor. In: _____ KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEN, T.M. **Princípios da Neurociência**. Barueri, SP: Manole. 472-491, 2001.

BASTOS, J.K.; CARVALHO, J.C.T.; SOUZA, G.H.B.; PEDRAZZI, A.H.P.; SARTI, S.J. Antiinflammatory activity of cubein, a ligand from the leaves of *Zanthoxylum maranjillo* Griseb. **Journal Ethnopharmacology**. 75: 279-282, 2001.

BARAUNA, S.C.; KASTER, M.P.; HECKERT, B.T.; NASCIMENTO, K.S.; ROSSI, F.M.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; RODRIGUES, A.L.; LEAL, R.B.; Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 85: 160-169, 2006.

BECK, P.L.; WALLACE, J.L. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Mediators Inflammation**. 6: 95-103, 1997.

BEHBEHANI, M.M.; FIELDS, H.L. Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. **Brain Research**. 170: 85-93, 1979.

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

BESSON, M.J.; DICKINSON, A. In: _____ **The pharmacology of pain**. Springer-Verlag. 130: 21-41, 1997.

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

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Models of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **Journal of Leukocyte Biology**. 70: 849-860, 2001.

BITENCOURT, F.S.; FIGUEIREDO, J.G.; MOTA, M.R.; BEZERRA, C.C.; SILVESTRE, P.P.; VALE, M.R.; NASCIMENTO, K.S.; SAMPAIO, A.H.; NAGANO, C.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W.R.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, A.M.; ALENCAR, N.M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding

agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**. 377: 139-148, 2008.

BORISH, L.C.; STEINKE, J.W. Cytokines and chemokines. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 111: 460-475, 2003.

BOURNE, Y.; ROUGE, P.; CAMBILLAU, C. X-ray structure of a biantennary octasaccharide-lectin complex refined at 2.1 Å resolution. **The Journal of Biological Chemistry**. 267: 197-203, 1992.

BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. **The Journal of Experimental Medicine**. 115: 543-466, 1962.

BRANDTZAEG, P.; BAEKKEVOLD, E.S.; FARSTAD, I.N.; JAHNSEN, F.L.; JOHANSEN, F.E.; NILSEN, E.M.; YAMANAKA, T. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? **Immunology Today**. 20: 141-151, 1999.

BREWER, C.F.; MICELI, M.C.; BAUM, L.G. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. **Current Opinion in Structural Biology**. 12: 616-623, 2002.

BRINDA, K. V.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Review Article: Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. **Biochemical Journal**. 391: 1-15, 2005.

BUDANTSEV, A.I.U.; KISLIUK, O.S.; SHULGOVSKIĬ, V.V.; RYKUNOV, D.S.; IARKOV, A.V. The brain in stereotaxic coordinates (a textbook for colleges). **Zhurnal Vysheĭ Nervnoĭ Deiatelnosti Imeni I Pavlova**. 43:1045-1051, 1993.

CAMPOS, F.R.; ALBUQUERQUE, F.A.A.; RAO, V.S.N.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**. 73: 116-120, 2002.

CANETTI, C.; SILVA, J.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **British journal of pharmacology**. 134: 1619-1628, 2001.

CAPAZ, F.R.; VASCONCELLOS, L.E.; DE MORAES, S.; NETO, J.P. The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**. 251: 228-236, 1981.

CARMAN, C.V.; JUN, C.D.; SALAS, A.; SPRINGER, T.A. Endothelial cells proactively form microvilli-like membrane projections upon intercellular adhesion molecule 1 engagement of leukocyte LFA-1. **Journal of Immunology**. 171: 6135-6144, 2003.

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

CAVADA, B.S.; IGLESIAS, M.M.; TRONCOSO, M.F.; TEIXEIRA, E.H.; TURYN, D.; DOMINICI, F.P. Glucose-mannose-binding lectins isolated from Brazilian beans stimulate the autophosphorylation of the insulin receptor in vitro. **Hormone and Metabolic Research**. 35:125-127, 2003.

CAVAILLON, J.M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: Myth or reality. **Cellular and Molecular Biology**. 47: 695-702, 2001.

CAVUN, S.; GOKTALAY, G.; MILLINGTON, W.R. The hypotension evoked by visceral nociception is mediated by delta opioid receptors in the periaqueductal gray. **Brain Research**. 1019: 237-245, 2004.

CECCATO, V. M.; CAVADA, B. S.; NUNES, E. P.; NOGUEIRA, N. A. P.; GRANGEIRO, M. B.; TEIXEIRA, E. H.; SAMPAIO, A. H.; ALVES, M. A. O.; RAMOS, M. V.; CALVETE, J. J.; GRANGEIRO, T. B. Purification and partial characterization of a lectin from *Canavalia grandiflora* Benth. seeds. **Protein and Peptide Letters**. 9: 67-73, 2002.

CHAN, G.H; FISCUS, R.R. Exaggerated production of nitric oxide (NO) and increases in inducible NO-synthase mRNA levels induced by the pro-inflammatory cytokine interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells of elderly rats. **Experimental Gerontology**. 39: 378-394, 2004.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAÍ, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 21: 926-931, 2002.

CHEN, J.C.; CHEN, H.M.; SHRY, M.H.; FAN, L.L.; CHI, T.Y.; CHI, C.P.; CHEN, M.F. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. **Journal of the Formosan Medical Association**. 99: 213-218, 2000.

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

COELHO, M.B.; DE SOUZA, I.A.; FREIRE, M.G.M.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; MACEDO, M.L.R. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**. 48: 529-535, 2006.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In:_____ CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins pathologic basis of disease**. Philadelphia: WB Saunders Company. 546-574, 1999.

CONE, J.B. Inflammation. **The American Journal of Surgery**. 182: 558-562, 2001.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**. 107: 660-664, 1992.

CUNHA, J.M.; SACHS, D.; CANETTI, C.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. The critical role of leukotriene B4 in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. **British Journal of Pharmacology**. 139, 1135-1145.

CUNHA, T.M.; VERRI, JR.W.A.; VALERIO, D.A.R.; GUERRERO, A.T.; NOGUEIRA, G.N.; VIEIRA, S.M.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed type hypersensitivity in mice. **European Journal of Pain**. 12: 1059-1068, 2008a.

CUNHA, T.M.; VERRI, JR.W.A.; SCHIVO, I.R.; NAPIMOGA, M.H.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**. 83: 824-832, 2008b.

CUNHA, T.M.; VERRI, W.A.JR.; FUKADA, S.Y.; GUERRERO, A.T.; SANTODOMINGO-GARZÓN, T.; POOLE, S.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. **European Journal of Pharmacology**. 573: 221-229, 2007.

CUNHA, T.M.; VERRI, JR.W.A.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 102: 1755-1760, 2005.

DAÍ, Y.; YE, W.C.; WANG, Z.T.; MATSUDA, H.; KUBO, M; BUT, P.P.H. Antipruritic and antinociceptive effects of *Chenopodium album L.* in mice. **Journal Ethnopharmacology**. 81: 245-250, 2002.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology**. 104: 15-29, 1970.

DJOUHRI, L.; LAWSON, S.N. Ab-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to the other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Research Reviews**. 46: 131-145, 2004.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**. 75 : 125-131, 1995.

DRISCOLL, K.E.; MAURER, J.K.; HIGGINS, J.; POYNTER, J. Alveolar macrophage cytokine and growth factor production in a rat model of crocidolite-induced pulmonary inflammation and fibrosis. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. 46: 155-169, 1995.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**. 4: 161-74, 1977.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurologic deficit in rats and mice. **The Journal of Neuroscience**. 19: 3423-3429, 1957.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. LI dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 107: 385-393, 1953.

ELSNER, J.; HOCHSTETTER, R, KAPP, A. Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils. **European Journal of Immunology**. 26: 1919-1925, 1996.

EVANS, W. C. A taxonomic approach to the study of medicinal plants and animal derived drugs. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. London, 15a ed., Ed. W. B. Saunders, 2002, cap. 5, p. 15-40.

FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions**. 30: 344-349, 1990.

FARIAS, R. A.; ANDRADE-NETO, M.; PINTO, L. S.; CASTELLON, R. R.; CALVETTE, J. J.; CAVADA, B. S. Caracterização química parcial e bioquímica de sementes de *Bauhinia forficata* Link. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 54, 349-353, 2004.

FARMER, S.G.; BURCH, R.M. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. 32: 511-519, 1992.

FELDMANN, M.; PUSEY, C.D. Is there a role for TNF-alpha in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis? Lessons from other chronic inflammatory diseases. **Journal of the American Society of Nephrology**. 7:1243-1252, 2006.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**. 334: 698-700, 1988.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.; DE ABREU CASTRO, M.S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. **Prostaglandins**. 16: 31-37, 1978a.

FERREIRA, S.H.; ZANIN, T.; LORENZETTI, B.B.; DE SOUZA, M.Z.; MEDEIROS M.C.; LEME, J.G. Increased vascular permeability, oedema and hyperalgesia caused by carrageenan in the rat's paw. **Agents Actions**. 8: 159-163, 1978b.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature: New Biology**. 240: 200-213, 1972.

FERRARI, L.F. Neurônio aferente primário: uma unidade funcional integrando a periferia e a medula espinal. Departamento de farmacologia. (Dissertação de Mestrado) USP, 2004.

FIGARELLA-BRANGER, D.; CIVATTE, M.; BARTOLI, C.; PELLISSIER, J.F. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. **Muscle & Nerve**. 28: 659-682, 2003.

FIGUEIREDO, J.G.; BITENCOURT, F.S.; MOTA, M.R.; SILVESTRE, P.P.; AGUIAR, C.N.; BENEVIDES, R.G.; NASCIMENTO, K.S.; DE MOURA, T.R.; DAL-SECCO, D.; ASSREUY, A.M.; CUNHA, F.D.; VALE, M.R.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**. 54: 736-744, 2009.

FOGED, C.; SUNDBLAD, A.; HOVGAARD, L. Targeting vaccines to dendritic cells. **Pharmaceutical Research**. 19: 229-238, 2002.

FOLKERTS, G.; KLOEK, J.; MUIJSERS, R.B.; NIJKAMP, F.P. Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**. 429: 251-262, 2001.

FORTES, Z.B.; FARSKY, S.P.; OLIVEIRA, M.A.; GARCIA-LEME, J. Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interactions in diabetes mellitus. **Diabetes**. 40: 1267-1273, 1991.

FRANÇA, D.S.; SOUZA, A.L.Z.; DOLABELLA, S.S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M.N. B vitamins induce an antinociceptive effect in acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **European Journal Pharmacology**. 421: 157-164, 2001.

FRANGOIANNIS, N.G.; MENDOZA, L.H.; LEWALLEN, M.; MICHAEL, L.H.; SMITH, C.W.; ENTMAN, M.L. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. **Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. 15: 1428-1430, 2001.

FREIRE, M.G.M.; DE SOUZA, I.A.; SILVA, A.C.M.; MACEDO, M.L.R.; LIMA, M.S.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**. 42: 275-280, 2003.

FREUND, J. The mode of action of immuno-pharmacological adjuvants. **Advances in Tuberculosis Research**. 1: 130-148, 1956.

FRIEDL, P.; WEIGELIN, B. Interstitial leukocyte migration and immune function. **Nature immunology**. 9: 960-969, 2008.

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

GADELHA, C.A.; MORENO, F.B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; ROCHA, B.A.; ASSREUY, A.M.; LIMA MOTA, M.R.; PINTO, N.V.; PASSOS MEIRELES, A.V.; BORGES, J.C.; FREITAS, B.T.; CANDURI, F.; SOUZA, E.P.; DELATORRE, P.; CRIDDLE, D.N.; DE AZEVEDO W.F. JR.; CAVADA, B.S. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal of Structural Biology**. 152: 185-194, 2005.

GARCIA, M.D.; FERNANDEZ, M.A.; ALVAREZ, A.; SAENZ, M.T. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa varozua* (Mirtaceae). **Journal Ethnopharmacology**. 91: 29-73, 2004.

GERARD, C.; ROLLINS, B.J. Chemokines and disease. **Nature Immunology**. 2: 108-15, 2001.

GERLACH, D.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U.; SCHMIDT, K. H. *N*-acetyl Dgalactosamine/ *N*-acetyl-D-glucosamine – recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **Immunology and Medical Microbiology**. 43: 223-232, 2005.

GHOSH, D.K.; SALERNO, J.C. Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. **Frontiers in Bioscience**. 8:193-209, 2003.

GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OZAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**. 285: 55-60, 1980.

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

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

GRANJEIRO, T.B. Clonagem, sequenciamento e expressão do gen da lectina (Con Br) de sementes de *Canavalia brasiliensis*. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (tese de doutorado). UFC, 1996.

GREENBERG, S.S.; OUYANG, J.; ZHAO, X.; GILES, T.D. Human and rat neutrophils constitutively express neural nitric oxide synthase mRNA. **Nitric Oxide**. 2: 203-212, 1998.

GRIFFIS, C.A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biological Research for Nursing**. 7: 297-312, 2006.

GRONE, A.; FONFARA, S.; BAUMGARTNER, W. Cell type-dependent cytokine expression after canine distemper virus infection. **Viral Immunology**. 15: 493-505, 2002.

GUPTA, R.A.; DUBOIS, R.N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. **Nature Reviews Cancer**. 1: 11-21, 2001.

GUTSTEIN, H.B.; AKIL, H. Opioid analgesics. In:_____HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Eds). Goodman & Gilman's: **The pharmacological basis of therapeutics**. 10.ed. New York. 569-619, 2001.

HARDY, J.D.; WOLFF, H.G.; GOODELL, H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. **The Journal of Clinical Investigation**. 29: 115-140, 1950.

HÉBERT, E. Endogenous lectins as cell surface transducers. **Bioscience Reports**. 20: 213-237, 2000.

HEDQVIST, P.; GAUTAM, N.; LINDBOM, L. Interactions between leukotrienes and other inflammatory mediators/modulators in the microvasculature. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 161: 117-119, 2000.

HOSTANSKA, K.; VUONG, V.; ROCHA, S.; SOENGAS, M.S.; GLANZMANN, C.; SALLER, R.; BODIS, S.; PRUSCHY, M. Recombinant mistletoe lectin induces p53-independent apoptosis in tumour cells and cooperates with ionising radiation. **British Journal of Cancer**. 88: 1785-1792, 2003.

HUI, L.I.; LE, W.U.; YUN-QING, L.I. Opioid peptides modulate the response of neurons of the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn to GABA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 307: 730-736, 2003.

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

HUNSKAAR, S.; BERGE, O.G.; HOLE, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. **Behavioural Brain Research**. 21: 101-108, 1996.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MAFFIA, P.; SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M. Nitric oxide inhibits leukocyte migration in carrageenan-induced rat pleurisy. **Inflammation Research**. 49: 411-417, 2000.

IGNARO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 84: 9265-9269, 1987.

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

International Legume Database & Information Service (ILDIS) (2005): In: _____ **Genus *Canavalia***. Versão 10.01, Janeiro de 2010.

JENSEN, K.; ANDERSEN, H.O.; OLESEN, J.; LINDBLOM, U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. **Pain**. 25: 313-323, 1986.

JONSDOTTIR, I.; HANNESDOTTIR, S.G.; OLAFSDOTTIR, T.A.; GIUDICE, G.D. Adjuvants LT-K63 and CPG enhance the activation of dendritic cells in neonatal mice. **Scandinavian Journal of Immunology**. 68: 469-475, 2008.

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

KAKINUMA, T.; HWANG, S.T. Chemokines, chemokine receptor, and cancer metastasis. **Journal of Leukocyte Biology**. 79: 639-651, 2006.

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

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. The perception of pain. In: _____ **Principles of Neural Science**, 4^a ed. EUA: MacGraw-Hill. 472-491, 2000.

KARABUCAK, B.; WALSCH, H.; JOU, Y.T.; SIMCHON, S.; KIM, S. The role of endothelial nitric oxide in the substance P induced vasodilation in bovine dental pulp. **Journal of Endodontia**. 31: 733-736, 2005.

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

KESHERWANI, V.; SODHI, A. Differential activation of macrophages in vitro by lectin Concanavalin A, Phytohemagglutinin and Wheat germ agglutinin: production and regulation of nitric oxide. **Nitric Oxide**. 16: 295-305, 2007.

KEKESI, G.; JOO, G.; CSULLOG, E.; PETER-SZABO, M.; BENEDEK, G.; HORVATHA, G. Dose-independent antinociceptive interaction of endogenous ligands at the spinal level. **Brain Research**. 1029: 93-102, 2004.

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

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**. 4: 206-220, 2005.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBEER, E.J. Acetic-acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**. 18: 412-417, 1959.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 88: 4651-4655, 1991.

KUHN, D.C.; WILLIS, A.L. A new potential mediator of arterial thrombosis whose biosynthesis is inhibited by aspirin. **Prostaglandins**. 4: 127-130, 1973.

KULBE, H.; LEVINSON, N.R.; BALKWILL, F.; WILSON, J.L. The chemokine network in cancer-much more than directing cell movement. **The International Journal of Developmental Biology**. 48: 489-496, 2004.

KUWABARA, K.; YASUI, K.; JYOYAMA, H.; MARUYAMA, T.; FLEISCH, J.H.; HORI, Y. Effects of the second-generation leukotriene B(4) receptor antagonist, LY293111Na, on leukocyte infiltration and collagen-induced arthritis in mice. **European Journal Pharmacology**. 402: 275-85, 2000.

LAINE, R.A. A calculation of all possible oligosaccharide isomer, both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures or a reducing hexasaccharide: the isomer barrier to develop of single method saccharide sequencing or synthesis systems. **Glycobiology**. 4: 16-19, 1994.

LANSEN, G.L.; HENSON, P.M. Mediators of inflammation. **Annual Review of Immunology**. 1: 335-359, 1993.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews. Immunology**. 2: 787-95, 2002.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacological Reviews**. 53: 597-652, 2001.

LECCI, A.; GIULIANI, S.; TRAMONTANA, M.; CARINI, F.; MAGGI, C.A. Peripheral actions of tachykinins. **Neuropeptides**. 34: 303-313, 2000.

LEE, J.J.; HAHM, E.T.; MIN, B.I.; HAN, S.H.; CHO, J.J.; CHO, Y.W. Roles of protein kinase A and C in the opioid potentiation of the GABAA response in rat periaqueductal gray neuron. **Neuropharmacology**. 44: 573-583, 2003.

LIOTTA, L.A. An attractive force in metastasis. **Nature**. 241: 24-25, 2001.

LIU, B.; BIAN, H.; BAO, J. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters**. 287: 1-12, 2010.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**. 353: 1607-1609, 1999.

LOTAN, R.; RAZ, A. Endogenous lectins as mediators of tumor cell adhesion. **Journal of Cellular Biochemistry**. 37: 107-117, 1988.

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

MACKAY, C.R. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. **Nature immunology**. 9: 988-998, 2008.

MacMAHON, S.B., CAFFERTY, W.B.J., MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Experimental Neurology**. 192: 444-462, 2005.

MASFERRER, J.L.; ZWEIFEL, B.S.; MANNING, P.T.; HAUSER, S.D.; LEAHY, K.M.; SMITH, W.G.; ISAKSON, P.C.; SEIBERT, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 91: 3228-3232, 1994.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; ANDO, S.; TOGUCHIDA, I.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 11: 1995-2000, 2003.

McCARTNEY-FRANCIS, N.L.; SONG, X.Y.; MIZEL, D.E.; WAHL, S.M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. **Journal of Immunology**. 166: 2734-2740, 2001.

MENDELL, J.R.; SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. **The New England Journal of Medicine**. 348: 1243-1255, 2003.

MESTRE, C.; PELISSIER, T.; FIALIP, J.; WILCOX, G.; ESCHALIER, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **American journal of pharmacology and toxicology Methods**. 32:197-200, 1994.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**. 66: 355-474, 2002.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. 57: 1-64, 1999.

MILLER, M.R.; MEGSON, I.L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**. 151: 305-321, 2007.

MIRANDA, E.F.; PRIETO, J.C.; PINARDI, G. Spinal synergy between nonselective cyclooxygenase inhibitors and morphine antinociception in mice. **Brain Research**. 1049: 165-170, 2005.

MOLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**. 84: 41-47, 1998.

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

MORRIS, M.R.; DEWITT, S.; LAFFAFIAN, I.; HALLETT, M.B. Phagocytosis by inflammatory phagocytes: experimental strategies for stimulation and quantification. **Methods in Molecular Biology**. 225: 35-46, 2003.

MOTA, M.R.L.; CRIDDLE, D.N.; ALENCAR, N.M.N.; GOMES, R.C.; MEIRELES, A.V.P.; GADELHA, T.S.; GADELHA, C.A.; OLIVEIRA, C.C.; BENEVIDES, R.G.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, A.M.S. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 374: 1-10, 2006.

MOURA, T.R.; BEZERRA, G.A.; BEZERRA, M.J.B.; TEIXERA, C.S.; BEZERRA, E.H.S.; BENEVIDES, R.G.; ROCHA, B.A.M.; SOUZA, L.A.G.; DELATORRE, P.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Canavalia boliviana* Piper seeds. **Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications**. 65: 213-215, 2009.

MUKHERJEE, D. Selective Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor and potential risk of cardiovascular events. **Biochemical Pharmacology**. 63: 817-821, 2002.

MUNDEY, M.K.; ALI, A.; MASON, R.; WILSON, V.G. Pharmacological examination of contractile responses of the guinea-pig isolated ileum produced by μ -opioid

receptor antagonists in the presence of, and following exposure to, morphine. **British Journal of Pharmacology**. 131: 893-902, 2000.

MURPHY, J.E.; ROBERT, C.; KUPPER, T.S. Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. **The Journal of Investigative Dermatology**. 114: 602-608, 2000.

MURPHY, P.M. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. **The New England Journal of Medicine**. 345: 833-835, 2001.

NAKAMURA, M., FERREIRA, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **European Journal Pharmacology**. 135: 145-53, 1987.

NAPIMOGA, M.H.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.N.; MOTA, M.L.; BITENCOURT, F.S.; ALVES-FILHO, J.C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R.B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; FREITAS, A.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **International Immunopharmacology**. 7: 824-835, 2007.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Review Immunology**. 3: 173-182, 2006.

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

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

NIKI, Y.; YAMADA, H.; SEKI, S.; KIKUCHI, T.; TAKAISHI, H.; TOYAMA, Y.; FUJIKAWA K.; TADA, N. Macrophage- and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1 alpha transgenic mice. **The Journal of Clinical Investigation**. 107: 1127-1135, 2001.

NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **Trends in Immunology**. 26: 158-165, 2005.

NUNES, B.S.; RESONNET, N.S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S.M.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H.; MOURA, T.R.; TEIXEIRA, E.H.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; CUNHA, F.Q.; NAPIMOGA, M.H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 379: 609-616, 2009.

OPPENHEIM, J.J.; ZACHARIAE, C.O.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. **Annual Review Immunology**. 9: 617-648, 1991.

OTTENSOOSER, F.; NAKAMIZO, Y.; SATO, M.; MIYAMOTO Y.; TAKIZAWA, K. Lectins detecting groups C streptococci. **Infection and Immunology**. 9: 971-973, 1974.

PALMER, R.M.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**. 16: 664-666, 1988.

PANES, J.; PERRY, M.; GRANGER, D.N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **British Journal Pharmacology**. 126: 537-550, 1999.

PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 37: 401-407, 2004.

PARENTE, L.; PERRETTI, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. **Biochemical Pharmacology**. 65: 153-159, 2003.

PAUL-CLARK, M.J.; GILROY, D.W.; WILLIS, D.; WILLOUGHBY, D.A.; TOMLINSON, A. Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. **Journal of Immunology**. 2: 1169-1177, 2001.

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

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**. 109: 347-352, 1995.

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

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

PLATTNER, V.E.; WAGNER, M.; RATZINGER, G.; GABOR, F.; WIRTH, M.; Target drug delivery: binding and uptake of plant lectins using human 5637 bladder cancer cells. **European Journal Pharmacology Biopharmacology**. 70: 572-576, 2008.

PLEUVRY, B.J.; LAURETTI, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacology & Therapeutics**. 71: 313-324, 1996.

PORTO, C.C. Exame Clínico: In: _____ **Bases para a Prática Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 37-40, 2004.

PROUDFOOT, A.E.; POWER, C.A.; ROMMEL, C.; Wells T.N.; Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. Review. **Seminars in Immunology**. 15: 57-65, 2003.

PUTZAI, A.; BARDOCZ, S.; EWEN, S.W. Uses of plant lectins in bioscience and biomedicine. **Frontiers in Bioscience**. 13: 1130-1140, 2008.

RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. **Current Opinion in Neurobiology**. 12: 195-204, 2002.

RAMOS, M.V.; MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; ROUGÉ, P. Interaction of the lectins from sub-tribe Diocleinae with specific ligands. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**. 8: 193-199, 1996.

RANG, H.P.; BEVAN, S.; DRAW, A. Chemical activation of nociception peripheral neurons. **British Medical Bulletin**. 47: 534-548, 1991.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zimosan and acetic acid in mice. **European Journal Pharmacology**. 387: 111-118, 2000.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Rheumatology**. 60: 404-415, 2001.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; HADDAD, J.J.; MASSAAD, C.A.; JABBUR, S.J.; SAADE, N.E. The role of the sympathetic efferents in endotoxin induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine up regulation. **Neuropharmacology**. 42: 864-872, 2002.

SAKURADA, T.; KOMATSU T.; SAKURADA, S. Mechanism of nociception evoked by intrathecal high dose morphine. **Neurotoxicology**. 26: 801-809, 2005.

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

SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; GIANANTI, M.; BRUNORI, P.M.; DI MATTEO, F.M.; MORELLI, A. Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor alpha. **Gut**. 35: 909-915, 1994.

SAUNDERS, B.M.; TRAN S.; RUULS, S.; SEDGWICK, J.D.; BRISCOE, H.; BRITTON, W.J. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. **Journal Immunology**. 174: 4852-4859, 2005.

SCHMELZ, M.; PETERSEN, J. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. **News in Physiological Sciences**. 16: 33-37, 2001.

SCHMIDT, R.R. In: _____ Stereochemistry of Organic and Bioorganic Transformations. Bartman, W. and Sharpless, K. B., Eds., VCH, Republic of Germany, p. 169-189, 1987.

SEELY, A.J.E.; PASCUAL, J.L.; CHRISTOU, N.V. Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. **Critical Care**. 7: 291-307, 2003.

SHARON, N.; LIS, H. In: _____ **Lectins**, Second Edition. Dordrecht/Netherlands. Kluwer Academic Publishers. 63-103, 2003.

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

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammation response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**. 18: 385-405, 2004.

SHIELDS, J.M.; HASTON, W.S. Behaviour of neutrophil leucocytes in uniform concentrations of chemotactic factors: contraction waves, cell polarity and persistence. **Journal of Cell Science**. 74: 75-93, 1985.

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

SODHI, A.; TARANG, S.; KESHERWANI, V. Concanavalin A induced expression of Toll-like receptors in murine peritoneal macrophages in vitro. **International Immunopharmacology**. 7: 454-463, 2007.

SICKER, T.; WUCHOLD, F.; KAISER, B.; GLUSA, E.. Systemic vascular effects of thrombin and thrombin receptor activating peptide in rats. **Thrombosis Research**. 101: 467-475, 2001.

SILVA, G.P.; MORENO, A.N.; MARQUES, F.; OLIVER, C.; JAMUR, M.C.; CASTELO, A.P.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1760: 86-94, 2006.

SIMON, S.I.; GREEN, C.E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**. 7: 151-185, 2005.

SMEETS, R.L.; JOOSTEN, L.A.; ARNTZ, O.J.; BENNINK, M.B.; TAKAHASHI, N.; CARLSEN, H.; MARTIN, M.U.; VANDENBERG, W.B.; VANDELOO, F.A.; Soluble interleukin-1 receptor accessory protein ameliorates collagen-induced arthritis by a different mode of action from that of interleukin-1 receptor antagonist. **Arthritis and Rheumatism**. 52: 2202-2211, 2005.

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

SOUZA, D.G.; CASSALI, G.D.; POOLE, S.; Effects of inhibition of PDE4 and TNF- α on local and remote injuries following ischemia and reperfusion injury. **British Journal of Pharmacology**. 134: 985-994, 1994.

SOUZA, G.E.P.; FERREIRA, S.H. Blockade of Antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**. 17: 97-103, 1985.

STOWE, D.F.; HEISNER, J.S.; CHUNG, W.W.; FUJITA, S. Volatile anaesthetics restore bradykinin and serotonin-induced coronary vasodilation after blocking nitric oxide synthase: lack of anaesthetic effects on KATP channels and prostaglandin pathways. **European Journal of Anaesthesiology**. 18: 219-230, 2001.

TACHIMOTO, H.; EBISAWA, M.; BOCHNER, B.S. Cross-talk between integrins and chemokines that influences eosinophil adhesion and migration. **International Archives of Allergy and Immunology**. 128: 18-20, 2002.

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

THURSTON, G.; RUDGE, J.S.; IOFFE, E.; ZHOU, H.; ROSS, L.; CROLL, S.D.; GLAZER, N.; HOLASH, J.; MCDONALD, D.M.; YANCOPOULOS, G.D. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. **Nature Medicine**. 6: 460-463, 2000.

TITHERADGE, M.A. Nitric oxide in septic shock. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1411: 437-455, 1999.

TOMISATO, W.; TSUTSUMI, S.; HOSHINO, T.; HWANG, H.J.; MIO, M.; TSUCHAIYA, T.; MIZUSHAIMA, T. Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions. **Biochemical Pharmacology**. 67: 575-585, 2004.

TROGSAKUL, S.; PANTHONG, A.; KANJANAPHOTI, D.; TAESOTIKUL, T. The analgesic and antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. **Journal Ethnopharmacology**. 85: 221-225, 2003.

TURNBERG, D.; BOTTO, M. The regulation of the complement system: insights from genetically-engineered mice. **Molecular Immunology**. 40: 145-153, 2003.

TURUTIN, D.V.; KUBAREVA, E.A.; PUSHKAREVA, M.A.; ULLRICH, V.; SUDINA, G.F. Activation of NF-kappa B transcription factor in human neutrophils by sulphatides and L-selectin cross-linking. **FEBS Letters**. 536: 241-245, 2003.

URBAN, M.O.; SMITH, D.J. Nuclei within the rostral ventromedial medulla mediating morphine antinociception from the periaqueductal gray. **Brain Research**. 652: 9-16, 1994.

VALE, M.L.; BENEVIDES, V.M.; SACHS, D.; BRITO, G.A.; ROCHA, F.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. **British Journal of Pharmacology**. 143: 833-844, 2004.

VALÉRIO, D.; FERREIRA, F.; CUNHA, T.; ALVES-FILHO, J.; LIMA, F.; DE-OLIVEIRA, J.; FERREIRA, S.; CUNHA, F.; QUEIROZ, R.; VERRI, JR.W.A. Fructose-1,6 bisphosphate reduces inflammatory pain-like behaviour in mice: role of adenosine acting on A receptors. **British Journal of Pharmacology**. 158: 558-568, 2009.

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

VANDERAH, T.W. Pathophysiology of pain. **The Medical Clinics of North America**. 91: 1-12, 2007.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Review**. 46: 295-309, 2004.

VASCONCELOS, S.M.M.; LIMA, S.R.; SOARES, P.M.; ASSREUY, A.M.S.; SOUSA, F.C.F.; LOBATO, R.G.; VASCONCELOS, G.S.; SANTI-GADELHA, T.; BEZERRA, E.H.; CAVADA, B.S.; PATROCÍNIO, M.C.A. Central Action of *Araucaria angustifolia* seed lectin in mice. **Epilepsy & Behavior**. 15: 291-293, 2009.

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

VICENTE-MANZANARES, M.; SÁCHEZ-MARDID, F.; Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. **Nature Reviews Immunology**. 4: 110-122, 2004.

VILCEK, J.; FELDMAN, M.; Historical review: cytokines as therapeutic and targets of therapeutics. **Trends in Pharmacological Sciences**. 25: 201-209, 2004.

VON-FREY, M. Untersuchungen über die Sinnesfunktionen der menschlichen Haut. **Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften**. 23:175-266, 1986.

WAGNER, J.G.; ROTH, R.A.; Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**. 52: 349-374, 2000.

WALKER, F. O.; HUNT, V. P. An open label trial of dextromethorphan in Huntington's disease. **Clinical Neuropharmacology**. 2: 322-330, 1999.

WALLACE, P.J.; WERSTO, R.P.; PACKMAN, C.H.; LICHTMAN, M.A. Chemotactic peptide-induced changes in neutrophil actin conformation. **The Journal of Cell Biology**. 99: 1060-1065. 1984.

WALTHER, M.; HOLZHUTTER, H.; KUBAN, R.J.; WIESNER, R.; RATHMANN, J.; KUHN, H. The inhibition of mammalian 15-lipoxygenase by the anti-inflammatory drug Ebselen: Dual type mechanism involving covalent linkage and alteration of the iron ligand sphere. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 56: 196-203, 1999.

WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: The path to a new understanding of acute inflammation. **News in Physiological Sciences**. 15: 107-113, 2000.

WINTERBOURN, C.C.; VISSERS, M.C.; KETTLE, A.J. Myeloperoxidase. **Current Opinion in Hematology**. 7: 53-58, 2000.

WONG, M.M.; FISH, E.M. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. **Seminars in Immunology**. 15: 5-14, 2003.

WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**. 288: 1765-1769, 2000.

WOTHERSPOON, F.; BROWNE, D.L.; MEEKING, D.R.; ALLARD, S.E.; MUNDAY, L.J.; SHAM, K.M.; CUMMINGS, M.H. The contribution of nitric oxide and vasodilator prostanoids to bradykinin-mediated vasodilation in type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**. 22: 697-702, 2005.

YAKSH, T.L. Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain. **The journal of Pain**. 7: 13-30, 2006.

YOSHIKAI, Y. Roles of prostaglandins and leukotriens in acute inflammation caused by bacterial infection. **Current Opinion in Infection Diseases**. 14: 257-263, 2001.

YOKOYAMA, C.; TANABE, T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxidase synthase and primary structure of enzyme. **Biochemical and Biophysical Research Communications**.1665: 3746-3752, 1989.

YOUSIF, M.H.M. Histamine-induced vasodilation in the perfused kidney of STZ diabetic rats: Role of EDNO and EDHF. **Pharmacological Research**. 51: 515-521, 2005.

ANEXO

Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice

Jozí Godoy Figueiredo · Flávio da Silveira Bitencourt · Ingrid Gonçalves Beserra · Cícero Silvano Teixeira · Patrícia Bastos Luz · Eduardo Henrique Salviano Bezerra · Mário Rogério Lima Mota · Ana Maria Sampaio Assreuy · Fernando de Queiroz Cunha · Benildo Sousa Cavada · Nylane Maria Nunes de Alencar

Received: 5 March 2009 / Accepted: 7 August 2009 / Published online: 25 August 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract The aim of the present study was to evaluate the potential antinociceptive and toxicity of *Canavalia boliviana* lectin (CboL) using different methods in mice. The role of carbohydrate-binding sites was also investigated. CboL given to mice daily for 14 days at doses of 5 mg/kg did not cause any observable toxicity. CboL (1, 5, and 10 mg/kg) administered to mice intravenously inhibited abdominal constrictions induced by acetic acid and the two phases of the formalin test. In the hot plate and tail immersion tests, the same treatment of CboL induced significant increase in the latency period. In the hot plate test, the effect of CboL

(5 mg/kg) was reversed by naloxone (1 mg/kg), indicating the involvement of the opioid system. In the open-field and rota-rod tests, the CboL treatment did not alter animals' motor function. These results show that CboL presents antinociceptive effects of both central and peripheral origin, involving the participation of the opioid system via lectin domain.

Keywords Antinociception · *Canavalia boliviana* lectin · Leguminosae · Neuropathic pain · Inflammatory pain · Toxicity

J. G. Figueiredo · C. S. Teixeira · E. H. S. Bezerra · B. S. Cavada
Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Federal University of Ceará,
60451-970 Fortaleza, CE, Brazil

F. da Silveira Bitencourt · I. G. Beserra · P. B. Luz ·
M. R. L. Mota · N. M. N. de Alencar
Department of Physiology and Pharmacology,
Federal University of Ceará,
Cel. Nunes de Melo 1127,
60430-270 Fortaleza, CE, Brazil

A. M. S. Assreuy
Superior Institute of Biomedical Sciences,
State University of Ceará,
Av. Paranajana 1700,
60740-000 Fortaleza, CE, Brazil

F. de Queiroz Cunha
Department of Pharmacology,
Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo,
14049-900 São Paulo, Brazil

N. M. N. de Alencar (✉)
Rua Coronel Nunes de Melo 1127,
CEP 60451-970 Fortaleza, Ceará, Brazil
e-mail: nylanemaria@yahoo.com.br

Introduction

Lectins are a group of widely distributed and structurally heterogeneous carbohydrate-binding proteins that comprise of distinct but evolutionary related families. Leguminosae is a family of lectins with similar amino acid sequences that strongly differ with respect to their carbohydrate-binding specificities (Van Damme et al. 1988). Although the physiological role of these proteins in plants is just beginning to be understood, lectins are becoming very important in the development of glycobiology (Sharon 1998). The number of reports is increasing regarding the anti-inflammatory activities of plant lectins (Alencar et al. 1999, 2005a; Assreuy et al. 1997, 1999; Mota et al. 2006; Santi-Gadelha et al. 2006). However, in respect to the role of these proteins in nociception events, few studies have demonstrated the antinociceptive activity of algal lectins (Bitencourt et al. 2008; Neves et al. 2007; Viana et al. 2002; Vieira et al. 2004) and even more rare are those describing this effect for leguminous lectins (Napimoga et al. 2007; Nunes et al. 2009).

Pain is one of the most prevalent conditions that limits productivity and diminishes quality of life. Although there currently exists an arsenal of effective and widely used analgesics, there are some concerns regarding their safety (Jage 2005; Whittle 2003). It is believed that current analgesic drugs, such as opioids and nonsteroidal anti-inflammatory drugs, are not useful in many cases because of their side effects and/or low potencies (Ahmadiani et al. 1998). For instance, morphine causes acute poisoning, hypotension, drug dependence, etc. As a result, searches for analgesic alternatives have become increasingly necessary and beneficial.

Despite the pharmaceutical industry's effort in the development of synthetic drugs, there is still an increasing interest in the market of the therapeutic potential of medicinal plants (Calixto et al. 2000; Koehn and Carter 2005). In fact, nowadays 25% of the prescribed drugs in the world are obtained directly or indirectly from plants. Moreover, 49% of the drugs developed between 1981 and 2002 were derived from natural products, or similar semisynthetic or synthetic compounds based on natural products (Koehn and Carter 2005).

The aim of the present work was to investigate the unexplored antinociceptive activity and subchronic toxicity of a lectin isolated from *Canavalia boliviana* (CboL) seeds.

Materials and methods

Drugs

The following substances were used: formalin, glacial acetic acid, morphine sulfate, and glucose (Merck, Darmstadt, Brazil); naloxone hydrochloride (Sigma Chemical Co., USA); and diazepam (Novaquimica, Brazil). The enzymatic kits used for evaluation of lectin systemic toxicity were from LABTEST (Diagnostic Tests, Brazil). All drugs and the lectin were dissolved in sterile 0.9% (w/v) NaCl (saline). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

Lectin preparation

C. boliviana (Leguminosae, Papilionoideae) was collected from the Amazon Rainforest located in the Amazonas state of Brazil. Seeds were ground to a fine powder in a coffee mill, and the soluble proteins were extracted at 25°C by continuous stirring with 0.15 M NaCl [1:10 (w:v)] for 1 h, followed by a 20 min centrifugation at 10,000×g at 4°C. The supernatant was applied in a Sephadex G-50 column (10×50 cm) previously equilibrated with 0.15 M NaCl containing 5 mM CaCl₂ and 5 mM MnCl₂. The purity of CboL preparations was monitored by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli

1970), in a 12.5% gel using standard molecular mass markers purchased from Fermentas™ (#SM0441). Protein bands were stained with 0.05% Coomassie brilliant blue R-250. The protein purification was performed according to Moura et al. (2009). The homogeneity of the sample was the same used for crystallization experiments indicating a high degree of purity.

Animals

Male Swiss mice (20–25 g) were housed in temperature controlled rooms (22–25°C) with access to water and food ad libitum. Experiments were carried out according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the U.S. Department of Health and Human Services (National Institutes of Health publication no. 85-23, revised 1985) and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

Antinociceptive study

Abdominal constrictions induced by intraperitoneal injection of acetic acid

Acetic acid (0.6%; 10 ml/kg body weight) was injected intraperitoneally (i.p.) into mice. Ten minutes later, the number of constrictions was recorded for 20 min (Koster et al. 1959). Animals were treated intravenously (i.v.) with 0.1 ml of CboL (0.5, 1, 5, and 10 mg/kg), glucose (0.5 M), CboL (1 mg/kg) combined with glucose (0.5 M), or sterile saline (0.9% w/v, NaCl).

Morphine (5 mg/kg) was administered subcutaneously (s.c.), 30 min before acetic acid as reference. In this protocol, the lectin was administered in combination with glucose (lectin-binding sugar). Glucose and lectin, alone or combined, were previously incubated for 30 min at 37°C before administration.

Formalin test

Twenty microliters of 1.5% formalin (v/v in distilled water) were s.c. injected into the ventral surface of the mice's right hind paws. Immediately after formalin injection, animals were individually placed in a glass observation chamber with a transparent floor, beneath which a mirror was mounted at a 45° angle to allow clear observation of animal paws. The time (in seconds) that animals spent licking the injected paws was recorded after the first 5 min of formalin injection (first phase, corresponding to a direct chemical stimulation of nociceptors) and after 20 min (second phase, involving release of inflammatory mediators), both for a duration of 5 min (De Souza et al. 2001). Animals were treated with sterile saline (0.1 ml, i.v.),

morphine (5 mg/kg, s.c.), or CboL (0.5, 1, 5, and 10 mg/kg, i.v.), 30 min before formalin injection.

Hot-plate test

The reaction time in seconds (between placement of animals onto a surface heated to $55\pm 0.5^\circ\text{C}$ and the occurrence of either licking of hind paws or jumping off from the surface) was recorded as the response latency on a hot plate (Ugo Basile, model-DS 37; Eddy and Leimback 1953). Baseline latencies of more than 20 s were excluded from the study. Mice were treated with CboL (0.5, 1, 5, and 10 mg/kg, i.v.) or with sterile saline (0.1 ml; i.v.), or morphine (5 mg/kg, s.c.; reference drug) as controls 30 min before the test. For detection of a possible involvement of the opioid system, animals were pretreated with naloxone (1 mg/kg; s.c.) 15 min before CboL or morphine. Measurements were performed before (0 time) and 30, 60, 90, 120, and 150 min thereafter treatment, with a cut-off time of 45 s to avoid animal paw lesion.

Tail-immersion test

The tail withdrawal response was determined by immersing the lower 3.5 cm of the animal's tail into a cup freshly filled with water from a large bath at a constant-temperature of 50°C until the typical response was observed. A 20 s cut-off was imposed to avoid tail damage by heat. Changes in tail-flick latency, Δt (in seconds), was calculated for each animal according to the formula: Δt (s) = postdrug latency – predrug latency (Janssen et al. 1963; Pinardi et al. 2003). The lower 3.5-cm portion of the tail was marked, and the animals were injected i.v. with 0.1 ml of CboL (1, 5, and 10 mg/kg) or saline, 30 min before the test.

Coordination and motor function evaluation

Rota-rod test

Possible nonspecific muscle relaxant or sedative effects of CboL were evaluated. The rota-rod apparatus consists of a bar (diameter 2.5 cm) divided into six compartments by disks of 25-cm diameter (Durham and Miya 1957), rotating at a constant speed of 14 rpm. Animals were previously selected 24 h before test, eliminating those mice which could not remain on the bar for two consecutive periods of 60 s. Animals were treated with sterile saline (1 ml; i.v.), CboL (1, 5, and 10 mg/kg; i.v.), or diazepam (5 mg/kg; i.p.), 30 min before test.

Open field

In order to verify motor activity, animals were placed in the center of an open-field arena and allowed for free

ambulation during 1 min. The locomotion frequency (number of floor units the animal entered with all its limbs) was observed during 4 min (Capaz et al. 1981). Mice were treated with sterile saline (0.1 ml; i.v.), CboL (1, 5, and 10 mg/kg; i.v.), or diazepam (5 mg/kg; i.p.), 30 min before the test.

Evaluation of systemic effects

Mice were i.v. injected daily with a single dose of saline or CboL (5 mg/kg) for 14 consecutive days. Animals were weighed at the beginning and at the end of treatment. Peripheral blood was collected from the retro-orbital plexus for leukogram and biochemical analysis. An aliquot of blood was mixed with ethylenediamine tetracetic acid, and total and differential leukocyte counts were carried out by standard manual procedures using light microscopy (Souza and Ferreira 1985). Standardized diagnostic kits by LABTEST® were used for spectrophotometric determination of aspartate amino transferase, alanine amino transferase, creatinine and urea in serum samples obtained after centrifugation of total blood without anticoagulants, at 2500 rpm for 15 min.

After sacrifice, liver, kidney, and heart were removed, weighed (wet weight expressed as grams/20 g of body mass) and macroscopically analyzed. Possible ulcerative lesions or hemorrhage were quantified and measured. The stomach was opened via longitudinal incision following the great curvature and exposed for evaluation of the number and grade of gastric mucosal lesions (Santucci et al. 1994).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard errors (SEM) and analyzed as follows: Student Neuman–Keuls test, two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's test, and Student's *t*-test for unpaired values (toxicology study). Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Acetic acid-induced writhing in mice

The results presented in Table 1 show the number of abdominal writhing episodes evoked by the intraperitoneal injection of acetic acid in mice and the antinociceptive effect of CboL. The treatment with CboL (1, 5, and 10 mg/kg) reduced significantly the number of writhings by 60%, 63%, and 64%, respectively, compared to normal animals injected with saline. The reference drug morphine (5 mg/kg) showed stronger analgesic effect (about 90%). However, the inhibitory effect of CboL (1 mg/kg) was reduced when the lectin

Table 1 Effect of *Canavalia boliviana* lectin in the abdominal constrictions induced by acetic acid

| Experimental groups | Number of abdominal constrictions (20min) | % inhibition |
|---|---|--------------|
| Saline | 21.9±2.7 | – |
| Morphine ^a (5 mg/kg; s.c.) | 2.2±0.5 ^b | 90 |
| Glucose ^a (10 mg/kg; i.v.) | 22.2±1.8 | – |
| CboL ^a 0.5 mg/kg (i.v.) | 18.8±5.3 | 14 |
| CboL ^a 1 mg/kg (i.v.) | 8.8±2.8 ^b | 60 |
| CboL ^a 5 mg/kg (i.v.) | 8.0±2.9 ^b | 63 |
| CboL ^a 10 mg/kg (i.v.) | 7.9±2.2 ^b | 64 |
| CboL ^a 1 mg/kg+glucose (0.5 M; i.v.) | 18.3±2.5 ^c | 16 |

Values are reported as mean±SEM; CboL *Canavalia boliviana* lectin, i.v. intravenously

^aAdministration, 30 min before acetic acid

^b and ^c indicate significant differences from acetic acid (0.6%; i.p.) and CboL 1 mg/kg, respectively ($P<0.05$). ANOVA followed by Student Neuman-Keuls ($n=8$)

was combined with its binding-sugar glucose (0.5 M) by 42%.

Formalin test

Systemic administration of CboL (1, 5, and 10 mg/kg), 30 min before formalin, showed significant antinociceptive effect, reducing the licking time in both the neurogenic and inflammatory phases of the formalin test. Table 2 shows the CboL inhibition of 45% in the first phase (at 10 mg/kg) and of 79% in the second phase (at 1 mg/kg). As expected, morphine significantly reduced the formalin response in both phases, by 71% and 98%, respectively.

Table 2 Effect of *Canavalia boliviana* lectin in the paw licking induced by formalin

| Treatment | Paw licking (s) | | | |
|---------------------------------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|
| | Neurogenic phase | | Inflammatory phase | |
| | First phase | Inhibition (%) | Second phase | Inhibition (%) |
| Saline | 60.9±5.2 | – | 39.4±4.9 | – |
| Morphine ^a (5 mg/kg; s.c.) | 17.3±3.4 ^b | 71 | 0.9±0.5 ^b | 98 |
| CboL ^a 0.5 mg/kg (i.v.) | 46.5±4.8 | 23 | 33.6±5.6 | 14 |
| CboL ^a 1 mg/kg (i.v.) | 40.6±5.8 ^b | 33 | 8.1±3.0 ^b | 79 |
| CboL ^a 5 mg/kg (i.v.) | 35.1±4.9 ^b | 42 | 15.5±2.6 ^b | 61 |
| CboL ^a 10 mg/kg (i.v.) | 33.1±5.3 ^b | 45 | 17.8±4.1 ^b | 55 |

Values are reported as mean±SEM; CboL *Canavalia boliviana* lectin, s.c. subcutaneously, i.v. intravenously

^aAdministration, 30 min before formalin

^bIndicates significant differences from formalin (1.2%; s.c.; $P<0.05$). ANOVA followed by Student Neuman-Keuls ($n=8$)

Hot-plate test

Results shown in Table 3 demonstrate that CboL (1, 5, and 10 mg/kg) injected i.v., 30 min before thermal stimuli, significantly increased the reaction time at 30, 60, 90, and 120 min compared to control (CboL 1 mg/kg: 30 min 78%; 60 min, 66%; 90 min, 64%; 120 min, 55%; CboL 5 mg/kg: 30 min, 91%; 60 min, 133%; 90 min, 93%; 120 min, 79%; and CboL 10 mg/kg: 30 min, 102%; 60 min, 133%; 90 min, 103%; 120 min, 100%). As expected, morphine s.c. injected significantly increased the animals' latency in response to thermal stimuli at 30 (134%), 60 (173%), and 90 min (122%). The antinociceptive effects of CboL (5 mg/kg) and morphine were blocked by naloxone.

Tail-immersion test

Table 4 shows that administration of CboL (1, 5, and 10 mg/kg) significantly increased the reaction time at 30, 60, and 90 min compared to control (CboL 1 mg/kg: 30 min, 17.8±3.5; 60 min, 20.2±2.1; 90 min, 16.5±2.0; CboL 5 mg/kg: 30 min, 18.9±3.1; 60 min, 21.5±2.5; 90 min, 18.3±2.8; and CboL 10 mg/kg: 30 min, 18.6±4.4; 60 min, 20.6±5.3; 90 min, 19.6±4.4), and morphine (5 mg/kg) caused a significant increase in the withdrawal response of the animal tails immersed in hot water, compared to control animals at 30 (22.4±3.6), 60 (18.2±2.4), and 90 min (13.8±6.4).

Rota-rod and open-field tests

Treatment of animals with CboL (1, 5, and 10 mg/kg) did not alter the behavior responses in the rota-rod test compared to control group (Fig. 1a). Similarly, the lectin, at any dose tested, did not alter the number of crossings,

Table 3 Effect of *Canavalia boliviana* lectin in the hot-plate test

| Treatment | Reaction time (s) | | | | | |
|---|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------|
| | Basal | 30min | 60min | 90min | 120min | 150min |
| Saline | 18.2±1.9 | 17.7±1.9 | 14.5±1.4 | 15.3±2.2 | 14.3±1.3 | 17.4±3.5 |
| Morphine ^a (5 mg/kg; s.c.) | 14.7±0.9 | 41.5±3.6 ^c | 39.6±5.4 ^c | 34.0±6.4 ^c | 19.08±2.2 | 17.6±4.8 |
| Naloxone ^a (1 mg/kg; s.c.) | 16.4±2.2 | 17.6±3.8 | 18.2±1.8 | 13.4±2.5 | 13.6±2.9 | 12.6±3.3 |
| CboL ^a 0.5 mg/kg (i.v.) | 15.7±4.5 | 21.3±3.8 | 18.7±2.4 | 18.2±2.8 | 17.7±2.2 | 17.6±2.8 |
| CboL ^a 1 mg/kg (i.v.) | 15.9±1.9 | 31.6±3.5 ^c | 24.1±2.1 ^c | 25.2±2.4 ^c | 22.3±3.9 ^c | 18.4±2.6 |
| CboL ^a 5 mg/kg (i.v.) | 15.2±3.5 | 33.9±3.1 ^c | 33.8±2.5 ^c | 29.6±2.8 ^c | 25.6±3.3 ^c | 18.9±4.1 |
| CboL ^a 10 mg/kg (i.v.) | 16.1±4.5 | 35.8±4.4 ^c | 34.6±5.3 ^c | 31.2±4.4 ^c | 28.6±4.1 ^c | 19.3±4.4 |
| CboL ^a 1 mg/kg+Naloxone ^b | 15.6±3.3 | 17.1±2.2 | 15.7±3.3 | 16.2±2.7 | 16.7±3.6 | 15.8±3.1 |
| Morphine ^a +Naloxone ^b | 15.8±1.2 | 10.0±2.6 | 11.6±3.2 | 12.8±2.1 | 14.5±1.9 | 17.0±2.1 |

Values are reported as mean±SEM; CboL *Canavalia boliviana* lectin, s.c. subcutaneously, i.v. intravenously

^aAdministration, 30 min before the hot-plate test

^bAdministration, 15 min before morphine or CboL

^cIndicates significant differences from control ($P<0.05$). ANOVA followed by Student Neuman–Keuls ($n=8$)

rearing, or immobility in the open-field test compared to controls (Fig. 1b). Diazepam (5 mg/kg) treatment decreased the responses evaluated in both tests.

In vivo toxicity

CboL (5 mg/kg; i.v.) injected in a single dose scheme over 14 consecutive days did not affect the animal corporal mass or the wet weight of animal organs such as liver, kidney, and heart, compared to animals injected with sterile saline. All the organs evaluated showed normal appearance and absence of oedema during the whole course of lectin treatment. Additionally, the stomach macroscopic evaluation showed an intact mucosa with no visible lesions in the two groups analyzed (CboL or saline treated). Values obtained for urea and creatinine, used as parameters of renal function, did not differ from controls. Moreover, hepatic function, evaluated via hepatic enzymes (alanine amine transferase and aspartate amine transferase), and the

number of blood circulating leukocytes were not altered by the lectin treatment in comparison to controls (Table 5).

Discussion

It is well known that pharmaceutical companies around the world are interested in developing safer and more effective drugs to treat pain. The present study evaluated the antinociceptive effect of a lectin isolated from *C. boliviana* seeds in several models of central and peripheral pain.

Intraperitoneal injection of acetic acid produces pain via activation of chemosensitive nociceptors (Stai et al. 1995) or irritation of visceral surfaces, which lead to the release of histamine, bradykinin, prostaglandins, and serotonin (Garcia et al. 2004). These mediators activate chemosensitive nociceptors that contribute to the development of inflammatory pain. CboL was able to reduce the writhings at all doses tested, suggesting that its antinociceptive effect could be

Table 4 Effect of *Canavalia boliviana* lectin in the tail-immersion test

| Treatment | Reaction time (s) | | | |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| | 30min | 60min | 90min | 120min |
| Saline | 3.8±0.3 | 4.8±0.5 | 4.4±0.4 | 4.2±0.3 |
| Morphine ^a (5 mg/kg; s.c.) | 22.4±3.6 ^b | 18.2±2.4 ^b | 13.8±6.4 ^b | 6.7±2.2 |
| CboL ^a 1 mg/kg (i.v.) | 17.8±3.5 ^b | 20.2±2.1 ^b | 16.5±2.0 ^b | 8.8±3.9 |
| CboL ^a 5 mg/kg (i.v.) | 18.9±3.1 ^b | 21.5±2.5 ^b | 18.3±2.8 ^b | 9.2±3.3 |
| CboL ^a 10 mg/kg (i.v.) | 18.6±4.4 ^b | 20.6±5.3 ^b | 19.6±4.4 ^b | 9.6±4.1 |

Values are reported as mean±SEM; CboL *Canavalia boliviana* lectin, s.c. subcutaneously, i.v. intravenously

^aAdministration, 30 min before the tail-immersion test

^bIndicates significant differences from control ($P<0.05$). ANOVA followed by Student Neuman–Keuls ($n=8$)

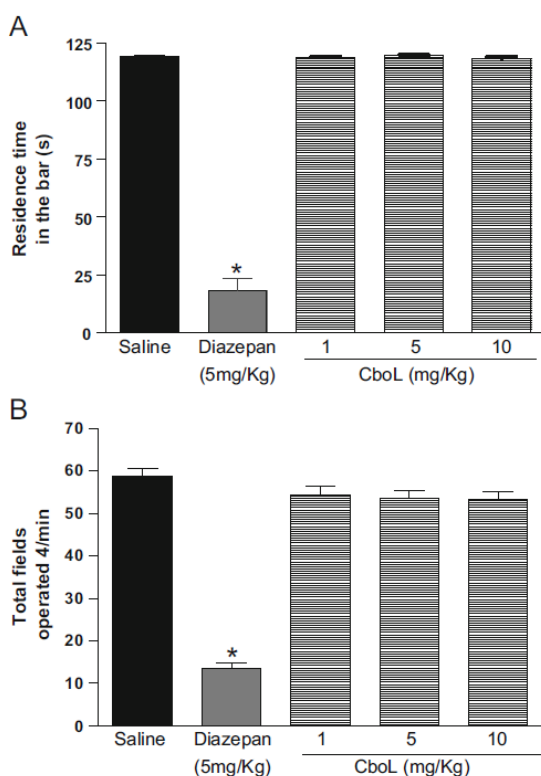


Fig. 1 Motor coordination (a) and spontaneous locomotion (b) are not affected by *C. boliviana* lectin. Animals were treated with saline (control; i.v.), diazepam (5 mg/kg, i.p.), or CboL (1, 5 and 10 mg/kg; i.v.), 30 min before being placed on the bar or in the open field, respectively. * $P < 0.05$ indicates statistical difference compared to the control group; mean \pm SEM; ANOVA followed by Bonferroni's test ($n = 8$)

related to the inhibitory action on the mediators release in response to acetic acid. Thus, antinociceptive activity of opioid agonists, opioid partial agonists, and nonsteroidal anti-inflammatory agents can be initially determined by the writhing test (Gaertner et al. 1999). Furthermore, we demonstrated that the CboL effect was nearly completely abolished by pretreatment with the lectin-binding sugar. This finding supports the hypothesis that lectin biological effects involve the lectin domain, amongst others (Alencar et al. 2005b, c, d; Assreuy et al. 1997, 1999; Bitencourt et al. 2008).

It is well known that the formalin test comprises of two phases: the neurogenic phase involving direct stimulation of nociceptors and release of substance P and the inflammatory phase involving release of serotonin, histamine, bradykinin, and prostaglandins (Gaertner et al. 1999; Tjolsen et al. 1992). The second phase is characterized by inflammatory pain triggered by a combination of stimuli,

including inflammation of peripheral tissues and central sensitization (Tjolsen et al. 1992; Tjolsen and Hole 1997). In the latter phase, different chemical mediators are involved: excitatory amino acids, neuropeptides, PGE₂, nitric oxide, and kinins (Malmberg and Yaksh 1995; Omote et al. 1998; Santos et al. 1999; Tjolsen and Hole 1997; Vanegas and Schaible 2001).

The action of analgesic drugs differs in the two phases of the formalin test. Opiates, which act centrally for the most part, inhibit both phases similarly (Hunnskaar and Hole 1987; Shibata et al. 1989). However, nonopioid analgesics, including dipyrrone, with both central and peripheral site of actions, produce an antinociceptive effect in both phases of the formalin test, especially in the second phase, in which pain is inhibited at lower doses than those necessary to be inhibited in the first phase (Shibata et al. 1989). The majority of lectin reports demonstrate periphery antinociceptive effects (inflammatory pain) (Bitencourt et al. 2008; Napimoga et al. 2007; Nunes et al. 2009). However, in the present investigation, the activity of CboL was observed in the first phase of the formalin test, a phase in which, as demonstrated by morphine, the action occurs at the level of the central nervous system (Shibata et al. 1989). Additionally, CboL produced a significant effect on the second phase. Probably, the decrease in the licking time could be explained by the lectin inhibitory effect upon the biosynthesis and/or release and/or action of mediators responsible for inflammation, as suggested in other studies (Bitencourt et al. 2008; Napimoga et al. 2007; Nunes et al. 2009). It is

Table 5 Subchronic treatment with *Canavalia boliviana* lectin

| Parameters | Treatment (0.1ml; i.v.) | |
|------------------------------------|-------------------------|------------------|
| | Saline | CboL (5mg/kg) |
| Corporal mass (g) before | 29.10 \pm 1.6 | 28.86 \pm 1.8 |
| Corporal mass (g) after | 33.73 \pm 2.4 | 33.38 \pm 3.3 |
| Liver (g/10 g body weight) | 0.944 \pm 0.2 | 1.046 \pm 0.2 |
| Kidney (g/10 g body weight) | 0.154 \pm 0.02 | 0.148 \pm 0.03 |
| Heart (g/10 g body weight) | 0.126 \pm 0.03 | 0.113 \pm 0.02 |
| Total leukocytes $\times 10^3$ /ml | 7.086 \pm 1.9 | 7.120 \pm 2.3 |
| Neutrophils $\times 10^3$ /ml | 1.341 \pm 5.2 | 1.212 \pm 3.3 |
| Urea (mg/dl) | 44.99 \pm 3.7 | 47.95 \pm 3.9 |
| Creatinine (mg/dl) | 0.259 \pm 0.08 | 0.270 \pm 0.04 |
| ALT (U/l) | 38.70 \pm 4.0 | 51.42 \pm 7.1 |
| AST (U/l) | 76.70 \pm 9.4 | 78.17 \pm 6.0 |

CboL *Canavalia boliviana* lectin, *ALT* alanine amino transferase, *AST* aspartate amino transferase

Animals were injected daily in single doses during 14 consecutive days. After treatment, animals were weighed, blood sample collected for leukogram count and biochemical dosage, sacrificed, and the organs wet weight taken. Values are reported as mean \pm SEM. Student's *t* test ($n = 8$)

important to explain that the lectin antinociceptive effect was dose-dependent in the first phase and bell-shaped in the second phase. CboL produced a biphasic trend, with decreasing antinociception in the higher doses. Bell-shaped dose effect curves may reflect that the drug have two different and opposed actions or partial agonist activity at their receptors (Kekesi et al. 2004).

CboL increased the latency time for jumping or licking in the hot-plate test. These results suggest that the antinociceptive action of CboL is triggered by a central-acting mechanism. The role of opioid receptors in the modulation of nociception has been demonstrated (Sakurada et al. 2005). This central analgesic action was confirmed by the inhibitory effect of naloxone, a specific antagonist of morphinomimetic receptors (Munday et al. 2000). CboL was shown to interfere with opioid receptors, since its effect had been blocked by naloxone. The results also showed that the CboL did not alter locomotor activity. The depressing action of various analgesic drugs on central nervous and muscular systems can generate reduction of motor coordination in animals as well as in the expression of nociceptive behaviors (Soja et al. 2002). The locomotor impediment that occurs in response to the administration of related algogenic substances reflects the animal's state of prolonged immobility, "freezing", between behavioral episodes of pain. Pain produces various autonomic and behavioral reactions, depending on the location, and the open-field test allows easy observation of these conditions (Cavun et al. 2004).

CboL prolonged the tail-immersion latency, indicating an increase in the nociceptive threshold. The tail-immersion response is believed to be a spinally mediated reflex (Chapman et al. 1985). Moreover, Grumbach (1966) has shown that the effectiveness of analgesic agents in the tail-flick pain model is highly correlated with human pain relief.

It has been demonstrated in toxicological studies that leguminous lectins seem to be well tolerated by mice (Napimoga et al. 2007). Sub chronic treatment in mice did not affect animal body mass or the wet weight of important organs such as liver, heart, or kidney. The macroscopy of these organs, including stomach, appeared normal. Neither renal and hepatic function, nor the number of circulating leukocytes was altered by the lectin treatment.

In conclusion, this study demonstrates, for the first time, a modulatory effect of CboL on inflammatory pain in models of nociception through a naloxone-sensitive mechanism. CboL did not show signs of toxicity, appearing to be safe in mice. Further research would be of interest to explain the exact mechanism of this antinociceptive effect.

Acknowledgments This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação

Cearense de Amparo à Pesquisa. Drs. Ana Maria S. Assreuy, Benildo S. Cavada, Fernando de Q. Cunha, and Nylane Maria N. Alencar are senior investigators of CNPq (Brazil). We thank Patrícia Sâmara de Sousa, Ieda R. dos Santos, and Sérgio Roberto Rosa for their technical assistance.

References

- Ahmadiani A, Fereidoni M, Semnani S, Kamalinejad M, Sureni S (1998) Antinociceptive and antiinflammatory effects of *Sambucus ebulus* rhizome extract in rats. *J Ethnopharmacol* 61:229–235
- Alencar NMN, Teixeira EH, Assreuy AMS, Cavada BS, Flores CA, Ribeiro RA (1999) Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. *Mediators Inflamm* 8:107–113
- Alencar NMN, Cavalcante CF, Vasconcelos MP, Leite KB, Aragão KS, Assreuy AMS, Nogueira NAP, Cavada BS, Vale MR (2005a) Antiinflammatory and anti-microbial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol* 57:919–922
- Alencar VBM, Alencar NMN, Assreuy AMS, Mota ML, Brito GAC, Aragão KS, Bittencourt FS, Pinto VPT, Debray H, Ribeiro RA, Cavada BS (2005b) Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1805–1814
- Alencar VBM, Brito GAC, Alencar NMN, Assreuy AMS, Pinto VPT, Teixeira EH, Souza EP, Debray H, Ribeiro RA, Cavada BS (2005c) *Helianthus tuberosus* agglutinin directly induces neutrophil migration, which can be modulated/inhibited by resident mast cells. *Biochem Cell Biol* 83:659–666
- Alencar VBM, Assreuy AMS, Alencar NMN, Meireles AVP, Mota MRL, Aragão KS, Cajazeiras JB, Nagano CS, Brito GAC, Silva LMM, Pinto VPT, Sampaio AH, Debray H, Cavada BS, Ribeiro RA (2005d) Lectin of *Pisum arvense* seeds induces in vivo and in vitro neutrophil migration. *J Pharm Pharmacol* 57:375–381
- Assreuy AMS, Shibuya MD, Martins GJ, Sousa MLP, Cavada BS, Moreira RA, Oliveira JTA, Ribeiro RA, Flores CA (1997) Antiinflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators Inflamm* 6:201–210
- Assreuy AMS, Martins GJ, Moreira ME, Brito GAC, Cavada BS, Ribeiro RA, Flores CA (1999) Prevention of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. *J Urol* 161:1988–1993
- Bitencourt FS, Figueiredo JG, Mota MR, Bezerra CC, Silvestre PP, Vale MR, Nascimento KS, Sampaio AH, Nagano CS, Saker-Sampaio S, Farias WR, Cavada BS, Assreuy AM, Alencar NM (2008) Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 377:139–148
- Calixto JB, Beirith A, Ferreira J, Santos AR, Filho VC, Yunes RA (2000) Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother Res* 14:401–418
- Capaz FR, Vanconcelos LEM, De Moraes S, Palermo-Neto J (1981) The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 25:228–236
- Cavun S, Goktalay G, Millington WR (2004) The hypotension evoked by visceral nociception is mediated by delta opioid receptors in the periaqueductal gray. *Brain Res* 1019:237–245
- Chapman CR, Casey KI, Dubner R, Foley KM, Gracely RH, Reading AE (1985) Pain measurement: an overview. *Pain* 22:1–31
- De Souza FR, Figuera MR, Lima TTF, Bastiani J, Barcellos IB, Almeida CE, Oliveira MR, Bonacorso HG, Flores AE, Mello CF

- (2001) 3-Methyl 5-hydroxy-5-trichloromethyl-1H-1-pyrazolcarboxamide (MPCA) induces antinociception. *Pharmacol Biochem Behav* 68:525–530
- Durham NW, Miya TS (1957) A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. *J Am Pharm Assoc* 46:208–210
- Eddy NB, Leimbach D (1953) Synthetic analgesics LI dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exper Ther* 107:385–393
- Gaertner M, Muller L, Roos JF, Cani G, Santos ARS, Niero R, Calixto JB, Yunes RA, Delle Manache F, Cechinel-Filho V (1999) Analgesic triterpenes from *Sebastiania Schottiana* roots. *Phyto-medicine* 6:41–44
- Garcia MD, Fernandez MA, Alvarez A, Saenz MT (2004) Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa var. ozua* (Mirtaceae). *J Ethnopharmacol* 91:29–73
- Grumbach L (1966) The prediction of analgesic activity in man by animal testing. In: Knighton RS, Dumke PR (eds) *Pain*. Little Brown and Co, Boston, pp 163–182
- Hunskar S, Hole K (1987) The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30:103–114
- Jage J (2005) Opioid tolerance and dependence. Do they matter? *Eur J Pain* 9:157–162
- Janssen PAJ, Niemegeers CJE, Dony JHG (1963) The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail with drawal reflex in rats. *Arzneimittelforschung* 13:502–507
- Kekesi G, Joo G, Csullog E, Peter-Szabo M, Benedek G, Horvath G (2004) Dose-independent antinociceptive interaction of endogenous ligands at the spinal level. *Brain Res* 1029:93–102
- Koehn FE, Carter GT (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4:206–220
- Koster R, Anderson M, De Beer EJ (1959) Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* 18:412–414
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Malmberg AB, Yaksh TL (1995) The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. *Br J Pharmacol* 114:1069–1075
- Mota MR, Criddle DN, Alencar NM, Gomes RC, Meireles AV, Santi-Gadelha T, Gadelha CA, Oliveira CC, Benevides RG, Cavada BS, Assreuy AMS (2006) Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 374:1–10
- Moura TR, Bezerra GA, Bezerra MJB, Teixeira CS, Bezerra EHS, Benevides RG, Rocha BAM, Souza LAG, Delatorre P, Nagano CS, Cavada BS (2009) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Canavalia boliviana* Piper seeds. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 65 (1):213–215
- Munday MK, Ali A, Mason R, Wilson VG (2000) Pharmacological examination of contractile responses of the guinea-pig isolated ileum produced by μ -opioid receptor antagonists in the presence of, and following exposure to, morphine. *Br J Pharmacol* 131:893–902
- Napimoga MH, Cavada BS, Alencar NM, Mota ML, Bitencourt FS, Alves-Filho JC, Grespan R, Gonçalves RB, Clemente-Napimoga JT, Freitas A, Parada CA, Ferreira SH, Cunha FQ (2007) *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. *Int Immunopharmacol* 7:824–835
- Neves SA, Freitas ALP, Souza BWS, Rocha MLA, Correia MVO, Sampaio DA, Viana GSB (2007) Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. *Braz J Med Biol Res* 40:127–134
- Nunes BS, Resonnet NS, Dal-Secco D, Vieira SM, Cavada BS, Teixeira EH, Moura TR, Teixeira EH, Clemente-Napimoga JT, Cunha FQ, Napimoga MH (2009) Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 379:609–616
- Omote K, Kawamata T, Kawamata M, Namiki A (1998) Formalin induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. *Brain Res* 787:161–164
- Pinardi G, Sierralta F, Miranda HF (2003) Atropine reverses the antinociception of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the tail-flick test of mice. *Pharm Biochem Behav* 74:603–608
- Sakurada T, Komatsu T, Sakurada S (2005) Mechanism of nociception evoked by intrathecal high dose morphine. *Neurotoxicology* 26:801–809
- Santi-gadelha T, Gadelha CA, Aragão KS, Oliveira CC, Mota MRL, Gomes RC, De Freitas PA, Toyama MH, De Oliveira TD, Alencar NMN, Criddle DN, Assreuy AMS, Cavada BS (2006) Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seeds lectin. *Biochem Biophys Res Commun* 350:1050–1055
- Santos ARS, Miguel OG, Yunes RA, Calixto JB (1999) Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-Di-N-propyllo-belidol hydrochloride dehydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* 289:417–426
- Santucci L, Fiorucci S, Giansanti M, Brunori PM, Di Matteo FM, Morelli A (1994) Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor alpha. *Gut* 35:909–915
- Sharon N (1998) Lectins: from obscurity into the limelight. *Protein Sci* 7:2042–2048
- Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R (1989) Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 38:347–352
- Soja PJ, Taepavarapruk N, Pang W, Cairns BE, Mcerlane SA, Fragoso MC (2002) Transmission through the dorsal spinocerebellar and spinoreticular tracts: wakefulness versus thiopental anesthesia. *Anesthesiology* 97:1178–1188
- Souza GEP, Ferreira SH (1985) Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents Actions* 17:97–103
- Stai HY, Chen YF, Wu TS (1995) Anti-inflammatory and analgesic activities of extract from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Med* 61:1–8
- Tjolsen A, Hole K (1997) Animal models of analgesia. In: Dickenson A, Besson J (eds) *The pharmacology of pain*, vol 130. Springer Verlag, Berlin, pp 1–20
- Tjolsen A, Berge O, Hunskar S, Rosland JH, Hole K (1992) The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51:5–17
- Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, Rouge P (1988) Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionarily related proteins with diverse biological roles. *Crit Rev Plant Sci* 17:575–692
- Vanegas H, Schaible HG (2001) Prostaglandins and cyclooxygenases in spinal cord. *Prog Neurobiol* 64:327–363
- Viana GSB, Freitas ALP, Lima MML, Vieira LAP, Andrade MCH, Benevides NMB (2002) Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. *Braz J Med Biol Res* 35:713–722
- Vieira LAP, Freitas ALP, Feitosa JPA, Silva DC, Viana GSB (2004) The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. *Braz J Med Biol Res* 37:1071–1079
- Whittle BJT (2003) Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fundam Clin Pharmacol* 17:301–313