



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

MARIA JÚLIA BARBOSA BEZERRA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTI-NOCICEPTIVA E PRO-
CICATRIZANTE DE UMA NOVA LECTINA PURIFICADA DO MUCO DO
CARAMUJO *Achatina fulica* BOWDITH 1822**

**FORTALEZA
2015**

MARIA JÚLIA BARBOSA BEZERRA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTI-NOCICEPTIVA E PRO-
CICATRIZANTE DE UMA NOVA LECTINA PURIFICADA DO MUCO DO
CARAMUJO *Achatina fulica* BOWDITH 1822**

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

**FORTALEZA
2015**

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

-
- B469a Bezerra, Maria Júlia Barbosa.
Atividade anti-inflamatória, anti-nociceptiva e pro-cicatrizante de uma nova lectina purificada do muco do caramujo *Achatina fulica* Bowdith 1822 / Maria Júlia Barbosa Bezerra. – 2015.
132 f. : il., color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
1. *Achatina fulica* - Lectinas. 2. Lectinas - Agentes antiinflamatórios. 3. Lectinas - Avaliação.
I. Título.

CDD 574.192

MARIA JÚLIA BARBOSA BEZERRA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTI-NOCICEPTIVA E PRO-
CICATRIZANTE DE UMA NOVA LECTINA PURIFICADA DO MUCO DO
CARAMUJO *Achatina fulica* BOWDITH 1822**

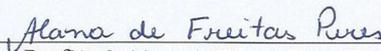
Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Curso de Pós - Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em: 02 / 06 / 15

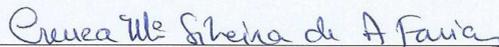
BANCA EXAMINADORA



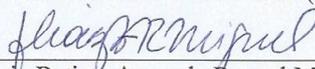
Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



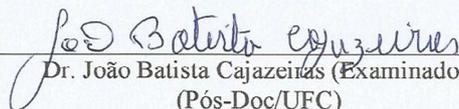
Prof^ª Dr^ª. Alana de Freitas Pires (Examinador)
Centro Universitário Estácio do Ceará (ESTÁCIO)



Prof^ª Dr^ª. Creuza Maria Silveira de Araújo Farias (Examinador)
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)



Dr^ª. Thairz Batista Azevedo Rangel Miguel (Examinador)
(Pós-Doc/UFC)



Dr. João Batista Cajazeiras (Examinador)
(Pós-Doc/UFC)

À minha avó Ady (*in memoriam*) que sempre me dedicou tanto carinho. Aos meus pais, Humberto e Wilca, meus grandes exemplos, aos meus irmãos Álisson e Déborah, minhas grandes alegrias e ao meu noivo Felipe, dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo quero agradecer a Força Divina que não me deixou cair mesmo quando os obstáculos pareciam intransponíveis. Por ter me dado anjos em forma de familiares e amigos que em nenhum momento me deixaram sozinha. À Deus agradeço por mais esta vitória.

Dedico minha Tese a minha amada Vozinha Ady, luz de sabedoria que tanto me iluminou quando ainda neste plano e que me iluminará durante toda a minha jornada. A ti minha vó meu amor infinito!

Aos meus pais Wilca e Humberto pelo exemplo de vida, pelo amor e apoio incondicional. Por estarem pertinho de mim mesmo quando eu estava longe. Sem vocês eu não teria conseguido realizar este sonho. Obrigada por tudo!

Aos meus irmãos Álisson e Déborah pelo suporte emocional que tantas vezes foi essencial e que em nossas brincadeiras transbordava o amor e a força necessários na jornada. E ao meu cunhado Roberto pelo constante incentivo no mundo acadêmico.

Ao meu noivo Felipe por tanto que suportou durante esse doutorado, as distâncias, o cansaço, os inúmeros estresses e agonias, por todas as vezes que me ouviu falar em lectinas e caramujos, mas que também vibrou e se emocionou em cada conquista. Agradeço pelo amor que a tudo suporta, tudo entende e tudo apoia. Obrigada por fazer a vida ser mais leve.

Ao meu orientador Professor Benildo por ter me dado a grande oportunidade de me tornar cientista, por me permitir ter e realizar sonhos e por me fazer entender que a graça não está apenas nas conquistas, mas sim em toda a jornada e em todo o aprendizado que vem com ela. Agradeço pela confiança no meu trabalho e pelos 10 anos de orientação no BioMol-Lab.

Agradeço minha co-orientadora Professora Kyria pela paciência e pelo incentivo com o meu projeto de tese, mesmo nas horas de dúvidas e dificuldades. Agradeço pelo apoio e incentivo constante para a realização das minhas duas viagens à Austrália.

Gostaria de agradecer à professora Helen Blanchard, minha orientadora durante meu primeiro estágio na Austrália no Glycomic Institut na Griffith University e também minha co-orientadora durante o doutorado sanduíche também na Griffith University. Gostaria de agradecer pela paciência e pelos desafios. Pela forma atenciosa de se preocupar com minha formação científica.

I would like to thanks professor Helen Blanchard, my advisor during my first stage at Glicomics Institut in Australia and also my co-advisor during my PhD sandwich also at Griffith University. Thank you for your pacience and for all challenge and also for worry about my scientific formation.

Ao Professor Edson Holanda e à Professora Ana Maria Assreuy por terem se entusiasmado com a ideia e aceito o desafio de testar a atividade cicatrizante, de inflamação e nocicepção da lectina no muco de *Achatina fulica*. E à Alana pelo poio e a disponibilidade. Graças a vocês o grande sonho de purificar uma lectina e avaliar seu potencial biotecnológico foi realizado.

Agradeço aos grandes tutores Professor Alexandre Sampaio, Professor Celso Nagano e Professor Bruno Anderson pelos anos de aprendizado e pelos valiosos ensinamentos que foram essenciais para a produção deste trabalho.

À todos os amigos que fiz durante os 10 anos de BioMol-Lab. Aos que me iniciaram na vida científica e hoje são meus grandes exemplos Gustavo e Taianá, e todos os outros grandes amigos que foram tão importantes durante toda essa trajetória: Raquel, Camila, Junior, Eduardo, Tales, Rafael, Bruno, Ito, Helton, Ana Claudia, Claudener, Mário, Mayron, Vava, Sâmia, Renata, Suzete, Mayara Maia, Jeferson, Alysson, Mayara Torquato, Claudia, Mayara Queiroz, Vanir, Vinicius, Alfa, Cecília, e tantos outros que passaram pelo laboratório.

Ao Raniere, Rômulo e Artur pelo apoio e por todas as trocas de experiências com lectina animal que tanto me ajudaram na execução desse trabalho. E à Kaira e ao Luis pelo valioso auxilio com as atividades biológicas.

Gostaria de agradecer em especial à professora Ana de Fátima Carvalho e as amigas e colegas de graduação em Ciências Biológicas Ana Luiza e Débora pela oportunidade

de ter o primeiro contato como o objeto de estudo desta tese em um projeto de Fisiologia Animal. Acredito que nada acontece por acaso e este projeto teve um valor imensurável.

Agradeço de coração a todos os grandes amigos que fiz no Glycomic Institut: Jaigueeth, Charles, Xing, Raul, Mohamed, KB, Mathew, Sai, Pradeed, Lisa, Larissa, Amber, Hanh, Raphael, Adam, Jess, Tongui, Preston, Javier e Jolin. Em especial a Maheshi, Juliane, Juliana, Carolina, Jenifer e Cindy pela amizade e a pelas valiosas conversas.

I thank from the heart all the great friends I made in Glycomic Institut: Jaigueeth, Charles, Xing, Raul, Mohamed, KB, Mathew, Sai, Pradeed, Lisa, Larissa, Amber, Hanh, Raphael, Adam, Jess, Tongui, Preston, Javier, Jolin, Kate and Andrea. Especially Maheshi, Juliane, Juliana, Carolina, Jenifer and Cindy for the friendship and for valuable conversations.

Aos amigos de infância, aos amigos biólogos e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação e para a produção deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho e pela bolsa sanduíche que permitiu o estágio no exterior.

“É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

(Cora Coralina)

RESUMO

O molusco terrestre *Achatina fulica* Bowditch 1822, também conhecido como caramujo-gigante-africano, é uma espécie exótica invasora que foi introduzida no Brasil para fins gastronômicos. Apesar de ser considerada uma praga por destruir plantações, não possui predador e estar na lista das 100 espécies mais invasivas do mundo, estudos mostram que o muco da *Achatina fulica* possui fins medicinais além de possuir propriedades bactericidas, atividade fungicida e comprovada atividade cicatrizante. Nos animais o muco tem funções de proteção imunológica, evita a desidratação e auxilia na locomoção e reprodução. Tais funções são possíveis pela presença de diversas macromoléculas no muco, entre elas glicoproteínas e lectinas. Alguns trabalhos já mostraram a presença de diferentes lectinas no muco de *Achatina fulica*, mas desde sua purificação poucas atividades biológicas foram realizadas com essa proteína. Neste contexto o presente trabalho descreve a purificação, caracterização e avaliação do potencial biotecnológico de uma lectina presente no muco de *Achatina fulica*. A proteína foi purificada em coluna de interação hidrofóbica de PhenilSepharose e aglutinou fortemente eritrócitos de coelho tratados e não tratados enzimaticamente. A lectina purificada foi chamada de AFL e mostrou ser dependente do íon cálcio, além de se manter ativa entre os pHs 6 a 10 sendo 8 seu pH ótimo e ser estável entre as temperaturas de 30° a 40°, perdendo gradativamente sua atividade até atingir a temperatura de 70°C e se tornar inativa. Foi comprovado que a lectina AFL reconhece ácido siálico possuindo afinidade fina ao ácido N-acetilneuramínico e ao KDN, glicano expresso em maior quantidade em células tumorais. Na avaliação do potencial biotecnológico desta lectina, este trabalho mostra que a AFL não possui toxicidade em teste contra *Artemia* sp. A lectina purificada possui atividade anti-nociceptiva, pois inibiu o número de contorções induzidas por ácido acético, o tempo de lambida da pata induzido por formalina, no entanto não inibiu a nocicepção térmica induzida pela placa quente. Além disso, apresentou potente ação anti-inflamatória pela inibição do edema induzido por formalina e peritonite induzida por ácido acético. Estas atividades estão associadas ao sítio de ligação a carboidratos. A lectina AFL apresentou também potente atividade cicatrizante em feridas cutâneas cirurgicamente induzidas em modelo murino sendo a primeira lectina animal a demonstrar essas atividades biológicas, o que abre um vasto campo para a pesquisa de moléculas de interesse biotecnológico.

Palavras chave: Lectina animal, *Achatina fulica*, atividade anti-inflamatória, atividade anti-nociceptiva, atividade cicatrizante

ABSTRACT

The land snail *Achatina fulica* Bowditch 1822, also known as African giant snail, is an invasive exotic species that was introduced in Brazil for gastronomic purposes. Although considered a plague by destroying plantations, having no predator and being on the list of the 100 most invasive species in the world, studies have shown that mucus of *A. fulica* has medicinal purposes and also has bactericidal properties, fungicidal activity and proven healing activity. In animals the mucus has immune protection functions, prevents dehydration and helps in movement and reproduction. Such functions are possible by the presence of various mucus macromolecules, including glycoproteins and lectins. Some works have shown the presence of different lectins in *Achatina fulica* mucus, but since purification a few biological activities were performed with this protein. In this context the present study describes the purification, characterization and evaluation of biotechnological potential of a lectin present in *Achatina fulica* mucus. The protein was purified on hydrophobic interaction column PhenilSephrose and strongly agglutinated rabbit erythrocytes treated and untreated enzymatically. The purified lectin was called the AFL and shown to be dependent on calcium ions, and remain active between pH 6 to 10 and 8 is the optimal pH and its stable over the temperature range of 30 to 40, gradually losing its activity to the temperature 70 ° C and become inactive. It has been demonstrated that the lectin AFL recognizes sialic acid having strong affinity to N-acetylneuraminic acid and KDN, glycan expressed in greater quantity on tumor cells. In the evaluation of biotechnological potential of this lectin, this work shows that the AFL does not have toxicity in a test against *Artemia* sp. The purified lectin has anti-nociceptive activity, it inhibited the number of writhes induced by acetic acid, the licking time of paw induced by formalin but was not able to inhibited thermal nociception induced by hot plate. Furthermore, it showed potent anti-inflammatory action by inhibition of edema induced by formalin and peritonitis induced by acetic acid. These activities are associated with the carbohydrate binding site. The lectin AFL also showed potent activity in healing wounds surgically induced in mouse model being the first animal lectin to demonstrate these biological activities, which opens a wide field for research for molecules of biotechnological interest.

Key Words: Animal Lectin, *Achatina fulica*, anti-inflammatory activity, anti-nociceptive activity, healing activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Comparação das estruturas da Sialoadesina, Siglec – 7 e Siglec – 9.....	25
Figura 2 – Domínio comum de uma lectina tipo C	27
Figura 3 – Representação esquemática das Galectinas	29
Figura 4 – Estruturas tridimensionais das lectinas de leguminosa Concanavalina A e da lectina tipo-L ERGIC-53.....	30
Figura 5 – Estrutura tridimensional de componente sérico amiloide P (SAP) de soro humano	31
Figura 6 – Estrutura de Calreticulina humana em dois ângulos de visualização diferentes....	32
Figura 7 – Representação estrutural de uma Calnexina	33
Figura 8 – Estrutura tridimensional de um receptor de manose 6-fosfato cátion dependente bovino complexado com pentamansil fosfato	33
Figura 9 – Estrutura tridimensional da lectina de HPA complexada com antígeno Tn	35
Figura 10 – Estrutura tridimensional da lectina AAA.....	36
Figura 11 – Estrutura tridimensional da Ficolina-2.....	37
Figura 12 – Estrutura de barril da proteína YKL-40	40
Figura 13 – Estrutura tridimensional da lectina Tachylectina-2 isolada de <i>Tachypleus tridentatus</i>	41
Figura 14 – Caramujo da espécie <i>Achatina fulica</i>	42
Figura 15 – Foto de <i>Artemia</i> sp	54
Figura 16 – Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de PhenilSepharose e atividade hemaglutinante dos picos da cromatografia.....	58
Figura 17 – Eletroforese SDS-PAGE 10%	59
Figura 18 – Gráficos de estabilidade a diferentes pHs da lectina AFL	61
Figura 19 – Gráficos de estabilidade a diferentes temperaturas da lectina AFL.....	62
Figura 20 – Eletroforese SDS-PAGE 10% corada com Coomassie Blue Brillant em A e com Reagente de Schiff em B	63
Figura 21 – Cromatografia de exclusão molecular em S200 da lectina AFL.....	65
Figura 22 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da proteína AFL purificada por cromatografia de exclusão molecular	66
Figura 23 – Principais manifestações locais da inflamação aguda.....	72
Figura 24 – Etapas da migração de neutrófilos ao longo dos vasos sanguíneos	75
Figura 25 – Anatomia de nociceptores	79

Figura 26 – Transmissão e vias de modulação da dor.....	80
Figura 27 – AFL inibe as contorções abdominais induzidas por ácido acético	85
Figura 28 – AFL inibe a nocicepção induzida por formalina.....	87
Figura 29 – Reversão da atividade da lectina AFL no teste da formalina quando incubada com lactose	88
Figura 30 – AFL inibe parcialmente a nocicepção térmica no teste da placa quente.....	89
Figura 31 – AFL reduz os níveis MPO no fluido peritoneal em modelo de peritonite induzida por ácido acético.....	90
Figura 32 – AFL inibe o edema de pata induzido por formalina	91
Figura 33 – Visão geral das respostas de cura após a lesão	95
Figura 34 – Representação da composição da pele	97
Figura 35 – Representação do procedimento cirúrgico em camundongos.....	102
Figura 36 – Gráfico representativo da evolução das áreas das lesões nos grupos experimentais	105
Figura 37 – Gráfico representativo da porcentagem de epitelização das lesões nos grupos experimentais.....	106
Figura 38 – Evolução do processo cicatricial das lesões tratadas com AFL e com NaCl 150 mM nos dias 2, 7 e 12 P.C.....	107
Figura 39 – Fotomicrografias de animais tratados com AFL durante o 7° e 12° dia.....	109
Figura 40 – Fotomicrografias de animais tratados com NaCl 150 mM durante o 7° e 12° dia	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante no extrato do muco de <i>A. fulica</i>	56
Tabela 2 – Concentração Mínima Inibitória dos açúcares em extrato do muco de <i>A. fulica</i> ..	57
Tabela 3 – Tabela de purificação da lectina do muco de <i>Achatina fulica</i>	60
Tabela 4 – Atividade de dependência a metal da lectina AFL	61
Tabela 5 – Resultado da leitura do numero de náuplios de <i>Artemia</i> sp. após 24 e 48 horas...	64
Tabela 6 – Resultado da inibição da lectina AFL.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: Graus Celsius	HE: Hematoxilina-Eosina
µg.mL⁻¹: Microgramas por mililitro	HGF: Fator de Crescimento do Hepatócito
µL: Microlitro	HPA: Lectina de <i>Helix pomatia</i>
µm: Micrometros	ICMA-1: Molécula-1 de adesão intercelular
Δ comprimento: Variação do comprimento da lesão	ICAM-2: Molécula-2 de adesão intracelular
Δ tempo: Variação do tempo	IL-1: Interleucina 1
AAA: Lectina de <i>Anguilla anguilla</i>	IL-6: Interleucina 6
AFL: Lectina do muco de <i>Achatina fulica</i>	i.p: Via intraperitoneal
BSA: Albumina sérica bovina	i.v.: Via intravenosa
CCAC: Canadian Council Animal Care	i.pl.: Via intraplantar
CD-MPR: Lectina Cátion dependente Manose 6 fosfato receptor	LAFFIN: Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Inflamação
CI-MPR: Lectina Cátion independente Manose 6 fosfato receptor	LacNAc: N-acetilactosamina
CNX: Calnexina	LIBS: Laboratório Integrado de Biomoléculas
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal	M: Mols
CR: Proporção de contração	MBP: <i>Mannose binding proteins</i>
CRP: Proteínas C reativas	MEC: Membrana extracelular
CRT: Calreticulinas	mg.Kg⁻¹: Miligrama por kilo
DRC: Domínio de reconhecimento a carboidrato	mg.mL⁻¹: Miligrama por mililitro
EGF: Fator de crescimento epidérmico	mgP.mL⁻¹: Miligrama de proteína por mililitro
E.P.M: Erro Padrão da Média	MIC: Concentração Mínima Inibitória
ER: Proporção de epitalização	mL: Mililitro
ERGIC-53: <i>ER Golgi intermediate compartment protein of 53 kDa</i>	mM: Milimolar
FGF: Fator de Crescimento dos fibroblastos	mm.dia⁻¹: Milímetros por dia
FGF-7: Fator de crescimento de ceratinócito	MMP: Metaloproteinases de matriz
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio	MPO: Mieloperoxidase
HB-EGF: Fator de crescimento epidérmico <i>Heparin-binding like</i>	NaCl: Cloreto de sódio
HCl: Ácido clorídrico	NO: Óxido nítrico
	O₂: Oxigênio
	PAF: Fator de Ativação Plaquetário
	PBS: Tampão Fosfato Salino

P.C.: Pós-Cirúrgico

PCAM-1: Molécula de adesão entre célula endotelial e plaqueta

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PTX: Pentraxinas

pH: Logarítmo negativo da concentração de íons de hidrogênio

SAP: Componentes séricos amiloides P

s.c.: Via subcutânea

TGF- β : Fator de crescimento Transformador β

TNF: Fator de necrose tumoral

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

UECE: Universidade Estadual do Ceará

UFC: Universidade Federal do Ceará

UV: Luz ultravioleta

UH.mL⁻¹: Unidade de Hemaglutinação por mililitro

UH.mgP⁻¹: Unidade de Hemaglutinação por miligrama de proteína

v/v: Volume por volume

VCAM-1: Molécula-1 de adesão da célula vascular

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

VIP-36: *Vesicular integral membrane protein of 36 kDa*

X²: Teste do Qui-quadrado

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
1. REVISÃO LITERÁRIA.....	21
1.1 Lectinas: uma ferramenta biotecnológica	21
1.2 Histórico de Lectinas	23
1.3 Lectinas Animais	25
1.4 Caramujo <i>Achatina fulica</i>	42
1.5 Propriedades do muco de <i>Achatina fulica</i>	44
1.6 Proteínas isoladas de <i>Achatina fulica</i>	45
2. OBJETIVOS	47
2.1 Objetivo Geral	47
2.2 Objetivos Específicos	47
CAPÍTULO II - PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA DO MUCO DE <i>Achatina fulica</i> Bowditch 1822.....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1. Obtenção dos animais e coleta do muco	49
3.2 Purificação da lectina do muco de <i>A. fulica</i> em cromatografia de interação hidrofóbica em gel de PhenilSepharose	49
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida	50
3.4 Detecção da Atividade Hemaglutinante.....	50
3.5 Dosagem de proteínas solúveis.....	51
3.6 Cálculo da Atividade Específica.....	51
3.7 Avaliação da inibição da atividade hemaglutinante por açúcares.....	51
3.8 Caracterização físico-química da lectina AFL.....	52
3.8.1. Teste de dependência a metais	52
3.8.2 Teste de estabilidade a diferentes pHs	53
3.8.3 Teste de estabilidade a diferentes temperaturas	53
3.9 Análise de glicosilação	53
3.10 Ensaio de toxicidade com <i>Artemia</i> sp.	54
3.11 Cromatografia de Exclusão Molecular	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	56
4.1 Purificação da lectina nativa do muco de <i>Achatina fulica</i>	56
4.2 Caracterização Físico-Química AFL	61

4.2.1 Avaliação da dependência de Metais	61
4.2.2 Teste de estabilidade a diferentes pHs	62
4.2.3 Teste de estabilidade a diferentes temperaturas	63
4.3 Análise de Glicosilação.....	63
4.4 Atividade Toxicológica contra <i>Artemia sp.</i>	64
4.5 Cromatografia de Exclusão Molecular	65
4.6 Ensaio de inibição por diferentes tipos de açúcares	67
CAPÍTULO III - ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-NOCICEPTIVA DA LECTINA DO MUCO DE <i>Achatina fulica</i>	71
5. INTRODUÇÃO.....	72
5.1 Visão geral da Inflamação	72
5.2 Eventos vasculares da inflamação aguda.....	74
5.3 Eventos celulares da inflamação aguda	75
5.4 Dor e Nocicepção.....	78
5.5 Mecanismo de transmissão da dor	79
5.6 Dor de origem inflamatória.....	81
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
6.1 Animais	82
6.2 Atividades de nocicepção e inflamação induzidas por ácido acético (0,8% v/v).....	83
6.3 Teste de nocicepção e inflamação induzidos por Formalina	84
6.4 Modelo de nocicepção induzida por elevação de temperatura: Teste da Placa Quente..	85
6.5 Análise Estatística.....	85
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
7.1 AFL inibe a nocicepção induzida por ácido acético e formalina mas não por estímulo térmico	85
7.2 Atividade anti – inflamatória da AFL.....	90
CAPÍTULO IV - ATIVIDADE CICATRIZANTE DA LECTINA DO MUCO DE <i>Achatina fulica</i>	94
8. INTRODUÇÃO.....	95
8.1 Cicatrização	95
8.2 A pele.....	97
8.3 Mecanismo da cicatrização	99
9. MATERIAIS E MÉTODOS.....	102
9.1 Animais.....	102

9.2 Estratégia experimental e formulação dos tratamentos tópicos.....	102
9.3 Procedimento cirúrgico.....	103
9.4 Tratamento e avaliação macroscópica da atividade cicatrizante	104
9.5 Avaliação Histopatológica.....	105
9.6 Avaliação Estatística.....	105
10. RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
10.1 Avaliação da atividade cicatrizante da AFL	106
10.2 Avaliação Histopatológica	109
CAPÍTULO V – CONCLUSÃO GERAL.....	114
11. CONCLUSÃO.....	115
REFERÊNCIAS	116

**CAPÍTULO I -
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

1. REVISÃO LITERÁRIA

1.1 Lectinas: uma ferramenta biotecnológica

A descoberta das lectinas ocorreu a mais de um século por S. Weir Mitchell em 1860, no entanto somente nos últimos vinte anos houve um avanço acentuado na lectinologia com o aumento do número de lectinas isoladas, caracterizadas e analisadas de acordo com suas atividades biológicas, de tal forma que se alcançaram definições mais claras a respeito de suas estruturas e funções. Essas proteínas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo já encontradas em fungos, vírus, bactérias, insetos, animais e plantas (MOREIRA *et al.*, 1991), apresentando grande variedade de formas e tamanhos, sendo a maioria das lectinas estudadas a partir dos dois últimos grupos. A ubiquidade das lectinas reflete sua participação efetiva em atividades biológicas diversificadas podendo atuar de forma intra e intercelular tanto em processos fisiológicos como processos patológicos.

As lectinas são proteínas que se ligam tanto a carboidratos solúveis quanto aos grupos funcionais de cadeias de carboidratos que constituem glicoproteínas ou glicolipídeos achados nas superfícies das células. Essas proteínas têm a capacidade de se ligarem a carboidratos atuando no reconhecimento específico de estruturas glicídicas diversas mediando assim uma variedade de processos biológicos entre eles a capacidade citotóxica em células e organismos, aglutinação de células e bactérias, adesão e migração celular, interações célula-matriz, a ativação e diferenciação celular e indução de apoptose, (SALES *et al.*, 2000; DANGUY *et al.*, 2002), além de renovação de glicoproteínas séricas e respostas imunes inatas (VIJAYAN; CHANDRA, 1999). Por essas características as lectinas também são capazes de aglutinar eritrócitos e outras células como linfócitos, plaquetas, etc., além de induzir mitoses e efeitos citotóxicos sobre os linfócitos e aglutinação em vírus.

Alguns desses processos biológicos mediados por lectinas ocorrem devido ao carboidrato da superfície de uma célula se ligar ao sítio de ligação a carboidrato da lectina presente na superfície de outra célula. Algumas bactérias usam lectinas para se ligarem às células do hospedeiro durante o processo de infecção, por exemplo, a *E.coli* é capaz de permanecer no trato gastrointestinal devido interações de lectinas com carboidratos presentes na superfície de células do intestino. Da mesma forma o vírus influenza contém hemaglutinina que reconhece resíduos de ácido siálico de glicoproteínas localizadas na

superfície das células do hospedeiro. Outro processo biológico mediado por lectinas é quando o embrião é fixado ao endométrio do útero por meio de L-selectina (GUPTA, 2012).

Após anos de estudos das propriedades e de caracterizações, em 1995 Peumans e Van Damme propuseram a melhor e mais aceita definição para as lectinas, que “são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que possuem pelo menos um sítio não catalítico que se liga a mono ou oligossacarídeos, de forma específica e reversível, não alterando sua estrutura”. Essa definição é muito utilizada para descrever as lectinas vegetais, mas o conceito de “origem não imunológica” não se aplica quando se trata de lectinas animais. Vários estudos mostram a importância das lectinas no sistema imune dos animais, que podem atuar de duas formas: como primeira linha de defesa atuando diretamente contra o patógeno ou atuando indiretamente via gerenciamento do tráfego de leucócitos ou via transmissão de sinais entre células especializadas (KILPATRICK, 2000).

Do ponto de vista estrutural as lectinas animais são claramente distintas de anticorpos, no entanto existem as imunoglobulinas específicas a carboidratos (GALILU, 1993), caracterizadas como lectinas do tipo I, ou seja, esse grupo de lectinas contém um domínio tipo imunoglobulina e outro lectínico que reconhece ácido siálico. Dessa forma, Kilpatrick em 2000 propôs uma definição, denominando as lectinas como proteínas ou glicoproteínas que reconhecem carboidratos de maneira específica, mas não participam do metabolismo dos mesmos e não pertencem a nenhuma das principais classes de imunoglobulinas, sendo esta, portanto, a melhor definição para as lectinas animais.

Um importante novo enfoque tem sido dado ao estudo de lectinas pelo reconhecimento a carboidratos, sendo estas moléculas conhecidas como portadoras de informações biológicas. Essas proteínas podem então ser analisadas como decodificadoras de glicocódigos (GABIUS, 2000) e são capazes de distinguir entre sutis variações na estrutura de oligossacarídeos (AMBROSI *et al.*, 2005). Essa especificidade a carboidratos, moléculas que possuem enorme potencial codificador em comparação a outras macromoléculas como proteínas e ácidos nucléicos, faz com que as lectinas desempenhem papel crucial em diversos processos celulares. A interação entre as lectinas e os carboidratos ocorre por meio de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio estabelecidas entre o glicano e os resíduos de aminoácidos presentes no sítio de reconhecimento a carboidrato (WEIS; DRICKAMER, 1996). Dessa forma, o resultado de várias ligações fracas resulta em uma interação forte, sendo este resultado responsável por várias das atividades biológicas características das lectinas (GUPTA, 2012).

No crescente campo da biotecnologia essas proteínas têm despertado grande interesse. Muitas lectinas de plantas apresentam capacidade anti e pró-inflamatórias (ASSREUY *et al.*, 1997; FREIRE *et al.*, 2003), efeito vasodilatador (ASSREUY *et al.*, 2009) atividade inseticida (MACEDO *et al.*, 2007; BENETEAU *et al.*, 2010), agentes para *drug delivery* (MOLEMA; MEIJER, 1994), além de serem de grande interesse nos estudos de imunologia e biologia celular por apresentarem efeitos de imunossupressão e de mitogenicidade (SHARON; LIZ, 2004). Lectinas isoladas de alga e de plantas já demonstraram potente efeito na atividade cicatrizante (NETO *et al.*, 2011; CHAHUD *et al.*, 2009). Além disso, diversos estudos já comprovaram a eficiência do uso de lectinas em ações terapêuticas devido à capacidade de combater agentes patógenos. Holanda e colaboradores (2005) mostraram a atividade da lectina de alga vermelha contra o crescimento de bactérias gram-negativas. Lectinas de monocotiledôneas específicas a manose apresentaram atividade antiretroviral, devido à capacidade dessas lectinas se ligarem a glicoproteínas da cápsula viral, podendo ser uma ferramenta importante no combate a AIDS (BALZARINI *et al.*, 1991; 1992). Por possuírem habilidade para mediar a mucoadesão, citoadesão e citoinvasão de drogas, essas proteínas estão sendo estudadas para utilização em sistemas de liberação de drogas (GABOR *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2003).

No campo da oncologia, foi visto que as lectinas podem reconhecer células cancerosas em diferentes estágios de desenvolvimento, possibilitando a exploração dessas lectinas como marcadores histoquímicos e ferramentas importantes para o diagnóstico do câncer (SHARON; LIS, 2004; NARIMATSU *et al.*, 2009).

1.2 Histórico de Lectinas

Em 1853, Charcot e Robin observaram estruturas parecidas com cristais em tecidos patológicos. Estruturas semelhantes foram encontradas por Leyden, em 1872, em fluidos de asmáticos e estavam associadas com inflamação, posteriormente essas estruturas ficaram conhecidas como cristais de Charcot-Leyden. Hoje já se sabe que tais estruturas cristalinas eram na verdade a forma pura da proteína Galectina-10, mas o contexto de sua descoberta não se sabia que era a primeira lectina a ser descoberta (ACKERMAN *et al.*, 1993; KILPATRICK, 2002). De fato, os primeiros relatos de atividade causada por lectina animal ocorreram em 1860, nos estudos realizados por S. Weir Mitchell em seus experimentos com a cobra da espécie *Crotalus durissus* (MITCHELL, 1860 e 1886). Foi provado que o veneno

desta cobra possuía a capacidade de aglutinar eritrócitos. Em 1902, esta atividade foi confirmada por Flexner e Noguchy, quando relataram com mais detalhes a aglutinação (KILPATRICK, 2002).

Já as lectinas vegetais foram primeiramente descobertas e isoladas por Stillmark em 1888, quando ele estudava a toxicidade de semente de mamona (*Ricinus communis*) em sua tese de doutorado, e verificou que ao misturar eritrócitos com o extrato dessa semente ocorria hemaglutinação. A esta proteína foi dado o nome de ricina. Posteriormente, H. Hellin identificou efeitos semelhantes aos da ricina em proteínas de sementes de jeriquiti (*Abrus precatorius*), que também eram tóxicos, e a nova hemaglutinina foi nomeada de abrina. Essas duas proteínas foram eficientemente utilizadas nos estudos que estabeleceram os princípios de imunologia feitos por Paul Ehrlich em 1891. Ele observou que essas proteínas quando injetadas em ratos estimulavam a produção de anticorpos que inibiam a sua toxicidade e inibiam sua atividade aglutinante. Os anticorpos eram mais específicos e mais fáceis de utilizar do que antígenos de bactérias para elucidar a ação de antígenos e anticorpos.

O termo fitohemaglutinina foi primeiramente proposto por Elfstrand em 1898, referindo-se a proteínas hemaglutinantes vegetais. Karl Landsteiner, em 1900, descobriu as diferenças dos eritrócitos do grupo sanguíneo humano utilizando lectinas e criou o sistema ABO (WATKINS, 1999). Em 1907, Landsteiner e Raubitschek reportaram pela primeira vez a presença de lectinas não tóxicas em leguminosas como *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lens culinaris* e *Vicia sativa*, demonstrando que a toxicidade não é uma propriedade intrínseca da proteína. No ano de 1908, Landsteiner com a ajuda de H. Raubitschek testaram as atividades de extratos de diferentes sementes com eritrócitos de diferentes animais e demonstraram que os extratos possuíam atividades variadas. Esse foi o primeiro indício de que cada lectina possui capacidade hemaglutinante diferente.

Dando continuidade a lectinologia, outra descoberta, em 1919, foi feita por James B. Summer que isolou do feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) uma proteína chamada de Concanavalina A. Duas décadas depois Summer e Howell em 1936, descobriram que a Concanavalina A era capaz de aglutinar tanto células como eritrócitos, assim como precipitar glicogênio em solução. Eles também mostraram que a sacarose foi capaz de inibir a atividade dessa proteína, demonstrando pela primeira vez a especificidade de lectinas por açúcares. Desde então diversos outros pesquisadores já conseguiram purificar e caracterizar diversas outras lectinas.

A descoberta da seletividade das lectinas por eritrócitos foi o principal motivo para a introdução no novo termo lectina (*legere*, do latim, significando escolher, selecionar)

dado por C. Boyd e Elizabeth Shapleigh em 1954, para definir proteínas vegetais não só pela sua capacidade aglutinadora como também pelo seu sentido de selecionar especificamente essa interação. O enfoque dos estudos sobre lectinas sofreu uma grande mudança quando em 1960, Peter C. Nowell mostrou que a lectina do feijão - mulatinho (*Phaseolus vulgaris*) apresentava ação mitogênica, estimulando linfócitos a entrarem em mitose. Isto teve impacto não só na imunologia, mas também fez com que as lectinas passassem a ser aplicadas em estudos biomédicos.

Atualmente, diversos estudos relacionados às lectinas são realizados em diferentes áreas científicas, tendo se chegado à conclusão de que sua principal importância está centrada em suas propriedades biológicas, tendo sido encontradas envolvidas em intrincados processos bioquímicos e biológicos. A evolução dos estudos na área de pesquisa das lectinas abriu uma nova perspectiva dos estudos do sistema imune e ao mesmo tempo promoveu a implementação de novas rotas terapêuticas para o tratamento e prevenção de doenças.

1.3 Lectinas Animais

As lectinas animais são classificadas principalmente de acordo com as características do domínio de reconhecimento a carboidrato, suas identidades de sequência de aminoácidos, função desempenhada e características físico-químicas (KILLPATRICK, 2000). Estas proteínas estão intimamente relacionadas com o sistema imune dos animais, funcionando como primeira linha de defesa contra patógenos invasores (CASH *et al.*, 2006).

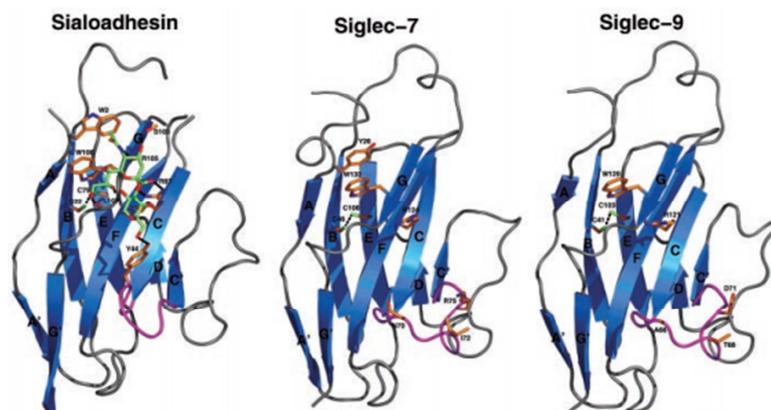
O primeiro a descrever as famílias de lectinas animais foi Kilpatrick em 2002, que identificou e classificou 12 famílias, dentre elas as mais estudadas, Tipo-C, Galectinas, Siglec, lectinas ligantes a manose e lectinas semelhantes às lectinas de leguminosas. Porém desde a classificação de Kilpatrick algumas famílias foram modificadas e novas famílias foram propostas, totalizando atualmente 19 famílias de lectinas animais (FRENCHA *et al.*, 2007; DRICKAMER, 2006; YOSHIDA; TANAKA, 2010). No entanto, mesmo dentro de uma mesma família de lectinas as funções biológicas podem variar muito e algumas lectinas possuem características tão singulares que não se encaixam bem em alguns dos grupos já definidos.

Lectinas do tipo I

As lectinas do Tipo I são pertencentes à superfamília das imunoglobulinas (IgSF), excluindo anticorpos e receptores de células-T ligantes de Ácido Siálico, um monossacarídeo encontrado na superfície das células (POWELL; VARKI, 1995). Atualmente, apenas uma subclasse das lectinas Tipo-I é bem caracterizada tanto estruturalmente quanto funcionalmente. Essa subclasse é chamada de Siglecs que é um subgrupo de imunoglobulinas com alta similaridade de sequência e especificidade à ácido siálico e sua nomenclatura provém do termo em inglês (Sialic acid-binding, **Ig**- type-**lectins**). São proteínas transmembranares que possuem na região do N-terminal um domínio Ig V-set (região variável do anticorpo) com um sítio de ligação para ácido siálico, seguindo de um número variável de domínios Ig C2-set (região constante do anticorpo) (CROCKER, 1998).

As lectinas do tipo Siglecs podem ser classificadas em dois subgrupos baseados principalmente na similaridade de sequência na região extracelular e intracelular e na conservação entre as diferentes espécies de mamíferos. A Sialoadesina (Siglec – 1), CD 22 (Siglec-2) e glicoproteína associada à mielina (MAG), constituem o primeiro grupo e possuem de 20 a 30% de identidade de sequência na região extracelular (ALPHEY *et al.*, 2003), estando presente em humanos e em ratos, sendo estas evolucionariamente conservadas. Excluindo as Siglec tipo MAG que são achadas unicamente no sistema nervoso, as Siglecs são predominantemente expressas no sistema hematopoiético e sistema imune e parecem mediar funções de adesão e sinalização (CROCKER, 2002). A figura 1 mostra exemplos de estruturas tridimensionais de Siglecs.

Figura 1 – Comparação das estruturas da Sialoadesina, Siglec – 7 e Siglec – 9.



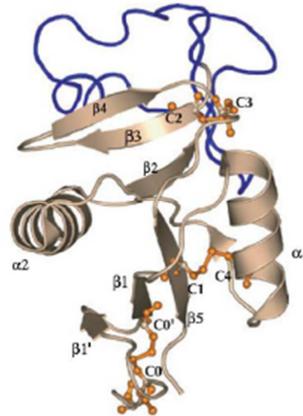
O subgrupo relacionado com CD33 (Siglec 3) também possui as recém descobertas Siglecs humanas 5 a 11, e parece estar evoluindo rapidamente por uma complexa expansão em diferentes linhagens de mamíferos. Esse subgrupo possui de 50 a 80% de similaridade de sequência e tem entre 1 a 4 domínios C- definidos e apresentam motivos baseados em tirosina citoplasmática envolvidas na sinalização e endocitose (ALPHEY *et al.*, 2003). Cada domínio é expresso em combinações específicas de células do sistema imune. Células do tipo B e monócitos expressam Siglec, que também são expressas em células NK, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas e macrófagos, no entanto a expressão de Siglec em células T é rara. Muitas das Siglecs relacionadas com CD33 foram descobertas recentemente, e suas funções ainda não estão bem definidas, mas as atividades destas proteínas são, provavelmente, envolver a regulação inibitória da função dos leucócitos, bem como outras funções relacionadas à imunidade e inflamação (VASTA; AHMED, 2008).

No decorrer da evolução a capacidade de produzir ácido siálico apareceu tardiamente, no entanto alguns patógenos vêm adquirindo a capacidade de driblar o sistema imune inato do hospedeiro pela produção de ácido siálico em suas superfícies como forma de disfarce, dessa forma, as Siglecs parecem estar envolvidas na infecção de mamíferos por esses patógenos. Estudos mostram que muitos vírus apresentam ácidos siálicos em seus capsídeos, uma vez que são produzidos por células hospedeiras, sendo esses glicanos utilizados não só como proteção, mas também como um mediador que facilita sua entrada na célula, explorando a capacidade de ligação a ácido siálico das Siglecs (ANGATA *et al.*, 2002; VIMR *et al.*, 2004).

Lectinas do tipo C

As lectinas do tipo C são dependentes de Cálcio (Ca^{2+}) sendo o metal diretamente relacionado com o reconhecimento a carboidrato e ligado à dois resíduos de glutamato presentes no DRC contribuindo para a manutenção da estrutura e funcionalidade da lectina (BERG *et al.*, 2002). As lectinas do tipo C possuem alto grau de conservação na estrutura dos seus domínios de reconhecimento a carboidrato (DRC), geralmente sendo compostos por 120 resíduos de aminoácidos (DRICKAMER, 1988). A conformação deste domínio é mostrada na figura 2 e é formada por um *loop* duplo estabilizado por duas pontes dissulfeto altamente conservadas que ficam próximas da base do segundo *loop* (ZELENSKY; GREASY, 2005).

Figura 2 – Domínio comum de uma lectina tipo C.



Fonte: Adaptado de ZELENSKY; GREASY, 2005.

Com o aumento do número de sequências primárias de diversas proteínas, foi verificado que nem todas as proteínas que possuem o domínio CTLD eram dependentes de cálcio ou mesmo se ligavam a carboidrato. Para acabar com a contradição, passou a ser utilizado o termo CTLD (*C-type lectin like*) ou domínio lectínico tipo C, para essas proteínas que possuíam esse domínio e são dependentes de cálcio ou se ligam a carboidratos (DRICKAMER, 1999; WEIS *et al.*, 1998).

Apesar de possuir aminoácidos conservados na estrutura primária do domínio de ligação a carboidratos, a superfamília de lectinas do tipo C é bastante heterogênea, possuindo apenas 14 resíduos invariantes e 18 posições conservadas. De acordo com essa heterogeneidade, atualmente é possível sub-dividir essa superfamília em 17 subfamílias (ZELENSKY; GREASY, 2005), sendo as de maior destaque as subfamílias das Colectinas e das Selectinas.

As Colectinas, ou lectinas com domínio Tipo Colágeno, são lectinas do Tipo-C solúveis e estão presentes predominantemente em mamíferos. Elas possuem na região amino-terminal um domínio tipo colágeno e no C-terminal o CTLD, e se caracterizam por cadeias básicas de polipeptídeos (35-40 kDa) que se organizam em tripla hélice por enovelamento das estruturas de colágeno. Essas subunidades podem ainda se agrupar assumindo novas formas de cruz (conglutininas) ou em forma de “buquê de flores” (KAWASAKI, 1998). As Colectinas participam do mecanismo de defesa do hospedeiro através da ativação do sistema complemento incluindo proteínas do soro ligantes a manose (MBP) e proteínas pulmonares surfactantes (FUJITA *et al.*, 2004). O domínio de ligação a carboidrato dessas lectinas são capazes de se ligarem a N-acetilglicosamina, manose, N-acetilmanosamina, fucose e glicose, sendo essas proteínas capazes de interagirem com os domínios glicídicos presentes nas

superfícies de vírus, bactérias, fungos e protozoários. Essas lectinas podem também interagir com receptores das células fagocitárias atuando como opsoninas.

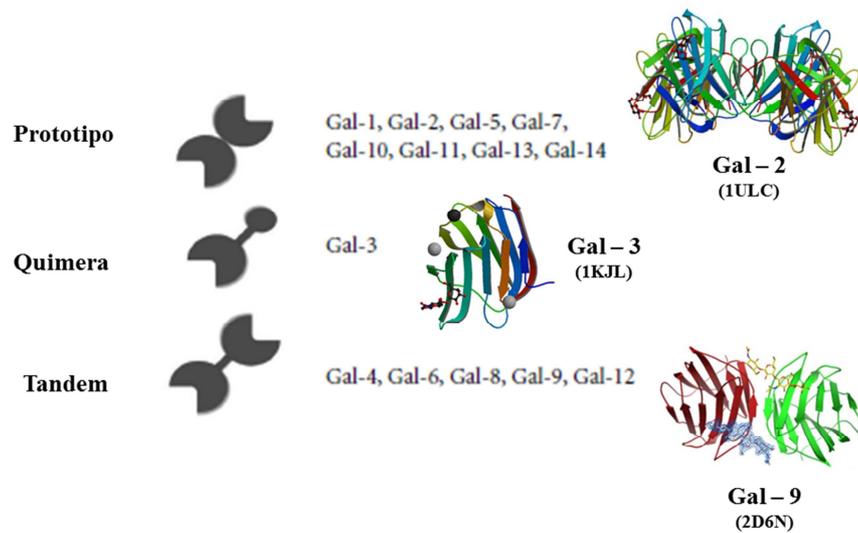
As Selectinas são glicoproteínas transmembranares dependentes de cálcio divalentes que se ligam a motivos fucosilados, especialmente sialyl-lewisX e mucinas. Essa família inclui as Selectinas expressas no endotélio (E-Selectinas), as Selectinas expressas em leucócitos (L-Selectinas) e as Selectinas expressas em plaquetas e endotélio (P-Selectinas), sendo que todas possuem domínios extracelulares de reconhecimento a carboidrato.

Essas proteínas estão intimamente relacionadas com o processo de inflamação, onde atuam nas interações iniciais de rolamento. Os ligantes das Selectinas são oligossacarídeos sializados ligados a uma coluna de glicoproteína tipo mucina. A expressão das Selectinas e seus ligantes é regulada pelas citocinas produzidas em resposta à infecção e a injúria. Os leucócitos expressam a L-selectina e também expressam ligantes para as E- e P-selectinas, os quais irão se ligar às respectivas selectinas expressas pelo endotélio. Como resultado ocorre a interação entre leucócitos e endotélio dando origem ao rolamento dos leucócitos (ROBBINS *et al.*, 2010).

Galectinas ou lectinas do Tipo S

As Galectinas formam um dos maiores e mais bem estudados grupos de lectinas animais. São proteínas não dependentes de íons metálicos e capazes de se ligar especificamente a resíduos de β -galactose, possuindo sequência conservada do domínio de ligação a carboidrato de aproximadamente 130 aminoácidos possuindo em torno de 14-35 kDa. Estas proteínas participam de diversos fenômenos fisiológicos tais como o desenvolvimento, diferenciação, morfogênese, imunidade, apoptose, metástase de células malignas entre outros (OGAWA *et al.*, 2011). Baseado na arquitetura estrutural de suas subunidades, as Galectinas podem ser classificadas em Tipo Proto, que apresentam domínios simples de ligação a carboidratos, do tipo repetições em *Tandem*, que apresentam dois domínios homólogos e as do tipo Quimera que apresentam um domínio galectínico com outro domínio não lectínico como mostra a figura 3 (OGAWA *et al.*, 2011).

Figura 3 – Representação esquemática das Galectinas.



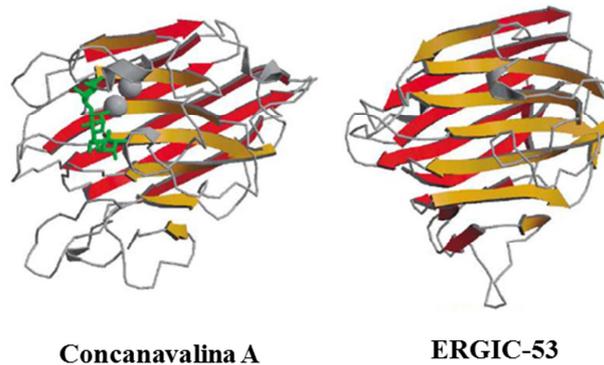
Fonte: Adaptado de OGAWA *et al.*, 2011. Tipo Prototipo (Galectina-2 de fungo *C. cinera* complexada com lactose – 1ULC; Galectina tipo Quimera (Galectina-3 humana complexada com LacNAc) e Galectina do tipo Tandem (Galectina-9 de rato complexada com LacNAc).

As Galectinas de mamíferos são classificadas em 13 subfamílias baseada na similaridade de sequências primárias (KILPATRICK, 2002) e atualmente já foram identificadas em diversos outros organismos entre eles peixes incluindo a enguia japonesa *Anguilla japonica*, a enguia elétrica *Electrophorus electricus*, a enguia *Conger myriaster*, o *Ictalurus punctuates*, o *Lophopsetta maculate*, além do peixe zebra *Danio rerio*, um dos organismos mais utilizados para o estudo de Galectinas.

Lectinas Tipo-L

Lectinas do tipo L são as que possuem o domínio de reconhecimento a carboidrato muito similar aos DRC de lectinas de leguminosas. Atualmente são conhecidas quatro tipos de lectinas tipo L: a ERGIC-53, uma proteína de 53 kDa presente nos compartimentos celulares intermediários entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, as ERGL que são proteínas tipo ERGIC-53, as VIP-36 que são proteínas de 36 kDa integrante da membrana vesicular e as VIPL que são proteínas tipo VIP-36 (VASTA, AHMED, 2008). Dos quatro tipos a lectina mais conhecida é a ERGIC-53 (FIGURA 4) (LORIS, 2002).

Figura 4 – Estruturas tridimensionais das lectinas de leguminosa Concanavalina A e da lectina tipo-L ERGIC-53.



Fonte: Adaptado de LORIS, 2002.

Atualmente sabe-se que tanto as lectinas do grupo ERGIC-53 quanto as VIP-36 são proteínas transmembranares, já as lectinas de leguminosas são proteínas solúveis que são secretadas, ou seja, embora sejam semelhantes, essas proteínas desempenham funções diferentes em animais e plantas. Já foi relatado que os resíduos-chave na formação tridimensional do DRC das lectinas do Tipo-L encontram-se conservados em plantas e animais, porém desempenham funções diferentes em ambos (DODD; DRICKAMER, 2001).

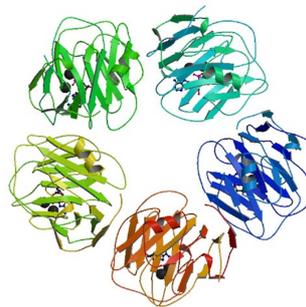
Pentraxinas

A família de lectinas Pentraxinas (PTX) possui cinco subunidades polipeptídicas idênticas formando um arranjo anelar em forma de disco pentamérico e são uma superfamília de proteínas plasmáticas envolvidas na imunidade inata tanto de vertebrados quanto de invertebrados. Essas proteínas são dependentes de cálcio e o grupo possui enovelamento semelhante às lectinas do tipo L, o β sanduíche *jelly roll*, encontrado também nas lectinas de leguminosas. Os principais tipos de proteínas dessa família de lectinas são as proteínas C reativas (CRP), proteína capaz de precipitar a fração polissacarídica C do *Streptococcus pneumoniae*, e os componentes séricos amilóides P (SAP). Baseado na estrutura primária das subunidades as pentraxinas são divididas em dois grupos: as pentraxinas curtas e as pentraxinas longas. As proteínas CRP e SAP são ambas pertencentes ao grupo de pentraxinas curtas. As pentraxinas solúveis agem como receptores de reconhecimento padrão com duas funções: proteção contra microorganismos extracelulares e autoimunidade. Apesar de ambas serem dependentes de Ca^{2+} não são consideradas lectinas do tipo C e tanto a CRP quanto a

SAP podem se ligar a fosfolipídeos e a DNA (DRICKAMER, 2002). Um exemplo de pentraxina do grupo longo é a pentraxina 3 (PTX3), que como outras proteínas do mesmo grupo são expressas em diferentes tecidos celulares e em partículas em células do sistema imunológico principalmente em células dendríticas e macrófagos em resposta a sinais pró-inflamatórios. A PTX3 interage com diversos ligantes incluindo fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e alguns patógenos atuando na ativação do sistema complemento e facilitando o reconhecimento de patógenos pelos fagócitos (GUPTA, 2012).

Algumas pentraxinas são expressas no cérebro e algumas estão envolvidas na plasticidade neuronal. A proteína SAP, mostrada na figura 5, é capaz de se ligar a outras proteínas, a DNA e a glicosaminoglicanos e se associa com depósitos amiloides em todas as formas de amiloidose, incluindo a doença de Alzheimer. Por se ligar a essas fibras amilóides expõe essas moléculas para o mecanismo de limpeza proteolítica podendo ser utilizada como futuro fármaco para a prevenção e tratamento de amiloidose.

Figura5 – Estrutura tridimensional de componentes séricos amilóides P (SAP) de soro humano.



Fonte: PDB 1LGN

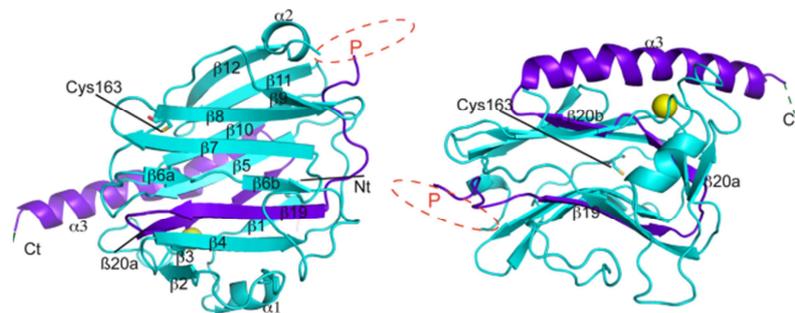
Calreticulinas e Calnexinas

As lectinas do tipo Calreticulina e Calnexina possuem afinidade para o oligossacarídeo Glc1 Man9 (GlcNAc)2 e são encontradas no retículo endoplasmático pertencendo a família de chaperonas e envolvidas na síntese e enovelamento de novos peptídeos. Podem atuar também no armazenamento de Ca^{2+} no retículo endoplasmático.

As Calreticulinas (CRT) são proteínas solúveis no lúmen do retículo endoplasmático e estão envolvidas em diversos processos fisiopatológicos além de se deslocar

para a superfície da célula e no meio extracelular para atuar em processos como a adesão, migração, proliferação celular e cura de feridas. Atuam também como sinalização para células em apoptose. As calreticulinas e sua proteína homóloga ligada à membrana Calnexina (CNX) possuem um domínio P rico em prolina além de possuírem a extremidade C-terminal altamente carregada.

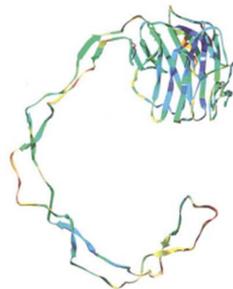
Figura 6 – Estrutura de Calreticulina humana em dois ângulos de visualização diferentes.



Fonte: Adaptada de CHOUQUET *et al.*, 2011. A região do N-terminal está em azul claro e a do C-terminal em azul escuro. O íon cálcio está representado pela esfera amarela e a localização aproximada da região do domínio P está delimitada.

As Calnexinas são proteínas de membrana do retículo endoplasmático que coordena o processamento de novas N-glicoproteínas e auxilia no processo de enovelamento. São proteínas formadas por dois diferentes domínios como mostra a figura 7, um domínio globular lectínico que permite a capacidade de se ligar a glicanos e o domínio longo que interage com outras proteínas inclusive com a ERp57 uma enzima que catalisa a formação de pontes dissulfeto (SCHRAG *et al.*, 2001).

Figura 7 – Representação estrutural de uma Calnexina.

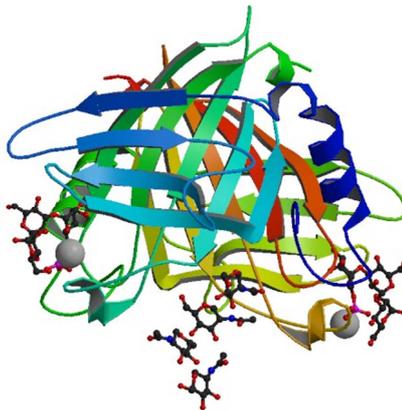


Fonte: Adaptado de SCHRAG *et al.*, 2001

Lectinas Tipo-P

As lectinas do tipo P possuem afinidade por manose-6-fosfato. Existem dois membros principais de lectinas da família tipo P: uma de 46 kDa dependente de cátion receptor de manose -6-fosfato (CD-MPR) e uma de 300 kDa independente de cátion receptor de manose-6-fosfato (CI-MPR). Ambas atuam intensamente em processo de fagocitose e processos de degradação por autofagia, pois possuem a capacidade de direcionar aproximadamente 60 tipos diferentes de enzimas hidrolíticas para os lisossomos (FIGURA 8) (KORNFELD; SLY, 2001; OLSON *et al.*, 2015).

Figura 8 – Estrutura tridimensional de um receptor de manose 6-fosfato cátion dependente bovino complexado com pentamansil fosfato.



Fonte: PDB: 1C39. O cátion manganês está representado pelas esferas em cinza.

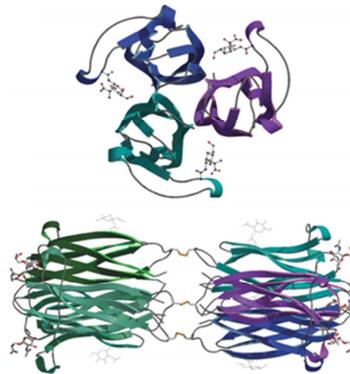
Anexinas

As anexinas possuem a capacidade de se ligar ao cálcio e a fosfolipídeos e apresentam pesos moleculares entre 30-40 kDa. A região N-terminal apresenta uma grande diversidade em suas sequências e comprimento, variando entre 11 a 196 resíduos. As anexinas têm ampla gama de funções biológicas relacionadas com suas propriedades de se ligarem a fosfolipídeos de membranas, tais como inibição da coagulação, interação com elementos de membrana e do citoesqueleto, transporte vesicular, exocitose e endocitose. São observadas mudanças de localização subcelulares do citosol para a membrana em anexinas intracelulares, sugerindo uma relação com a dinâmica do movimento de vesícula lipídica. Tem sido proposto que o nível celular das anexinas pode ser crítico para a regulação do crescimento celular já que a expressão de algumas anexinas depende da taxa de proliferação celular (GUPTA, 2012).

Lectinas Tipo-H

Em 2006, Sanchez e colaboradores durante os estudos estruturais da lectina de *Helix pomatia*, propuseram a criação de uma superfamília denominada de Tipo-H, baseado na homologia estrutural entre várias lectinas, dentre elas as Discoidinas, proteínas que apresentam afinidade para oligossacarídeos com resíduos de galactose. A estrutura tridimensional da lectina de *Helix pomatia* (HPA) é um hexâmetro onde cada monômero consiste em seis cadeias antiparalelas de β -sanduíche, formado por um dímero de trímeros (SANCHEZ *et al.*, 2006). A lectina HPA tem sido amplamente utilizada na histopatologia devido sua capacidade de se reconhecer epítomos presentes unicamente em linhagens células tumorais, entre elas a de câncer de mama e de útero. Essa lectina é capaz de reconhecer antígenos Tn e antígenos Forssman (LESCAR *et al.*, 2007).

Figura 9: Estrutura tridimensional da lectina de HPA complexada com antígeno Tn.



Fonte: Adaptado de LESCAR *et al.*, 2007. A lectina se apresenta como um dímero de trímeros.

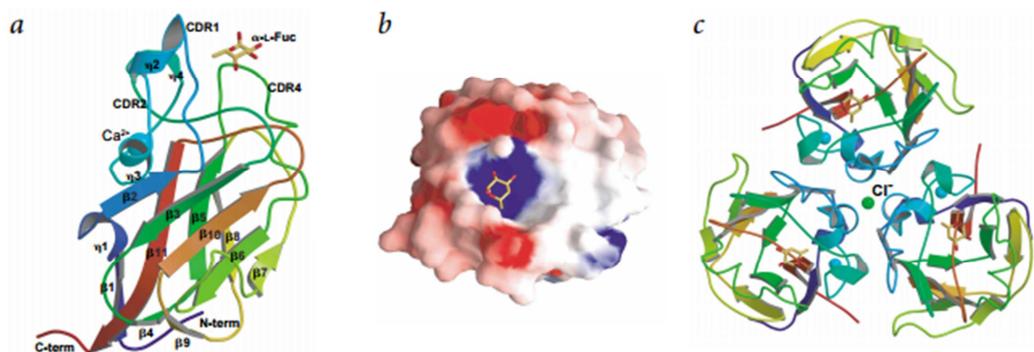
Lectinas Tipo-F

As lectinas do Tipo-F são proteínas fucose específicas que compartilham uma sequência característica. Os domínios do Tipo-F são encontrados desde bactérias a vertebrados (DRICKAMER, 2006). O enovelamento da lectina de *Anguilla anguilla* (AAA) é encontrado em diversas proteínas isoladas desde caranguejos a anfíbios, sendo proposto seu

papel na imunidade destes animais (BIANCHET *et al.*, 2002; HONDA *et al.*, 2000; SAITO *et al.*, 1997).

O domínio de reconhecimento a carboidrato da AAA é uma estrutura de β -barril com duas sequências de folhas β , uma com três e outra com cinco, ligadas por duas ligações dissulfeto. Uma extremidade do barril apresenta cinco regiões de *loop* que formam um anel com carga positiva que envolve o sítio de ligação a fucose, como mostra a figura 10. Em estado fisiológico esta proteína forma um trímero.

Figura 10 – Estrutura tridimensional da lectina AAA.



Fonte: Adaptado de Bianchet *et al.*, 2002. a) Estrutura tridimensional do monômero da lectina AAA complexada com L-fucose com detalhes dos elementos da estrutura secundária. b) Potencial eletrostático da molécula onde em azul são energias positivas e em vermelho as energias negativas. c) Conformação em trímero da molécula em estado fisiológico. O N-terminal está em azul e o C-terminal em vermelho, a fucose em amarelo, o cálcio é a esfera azul e em verde o cloro.

Lectinas tipo X / Interlectinas

A lectina XL35 foi isolada de embriões e dos ovos do sapo *Xenopus laevis* é cálcio dependente e específica para galactose possuindo importante atividade na formação da camada de fertilização dos ovos para evitar a poliespermia. Esta lectina oligomérica é liberada no meio extracelular na fecundação e se liga a glicoproteínas presentes na camada que reveste o oócito. Esta lectina é expressa também na gastrulação e pode ter função na adesão entre célula-célula e célula-matriz (OUTENREATH *et al.*, 1988; LEE *et al.*, 1997).

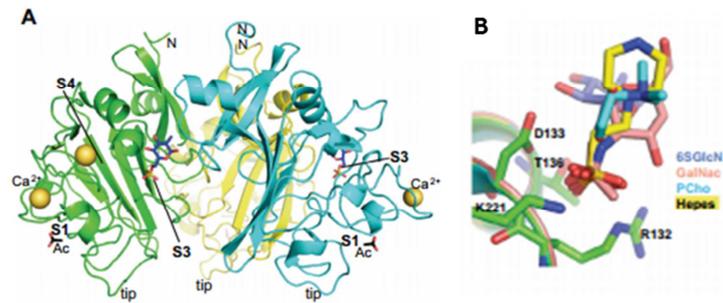
As interlectinas eram antigamente chamadas de Eglyctinas por terem sido isoladas e caracterizadas a partir de ovo de anfíbios, atualmente chamadas de lectinas do tipo X. São proteínas cálcio dependentes, N-glicosiladas e possuem especificidade para galactose. A

interlectina-1 isolada de ratos sugere ser o homólogo da lectina de oócito da espécie de sapo *Xenopus* XL-35. A interlectina humana (hITLN-1) madura é uma glicoproteína de 295 aminoácidos sendo um homotrímero de 120 kDa formado por polipeptídeos de 40 kDa unidos por pontes dissulfeto. Essas proteínas possuem afinidade por Galactopiranosil e, apesar de serem dependentes de Ca^{2+} , não apresentam em sua sequência de aminoácidos o motivo que as caracterizam como lectinas do tipo C. Já foram identificadas interlectinas em diversos animais, desde ascídias até o homem, com base na estrutura conservada do DRC (CHANG *et al.*, 2004; VARKI, 2004).

Ficolinas

Já as lectinas denominadas Ficolinas formam um grupo de proteínas solúveis que apresentam domínios do tipo-colágeno e do tipo-fibrinogênio, sendo o último domínio responsável pela atividade lectínica. Essas proteínas atuam no sistema imune inato e o domínio de reconhecimento a carboidrato dessas lectinas é peculiar pois reconhece grupos acetil, ou seja, esta proteína tanto pode se ligar a carboidratos como N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, etc, quanto à moléculas não glicídicas como N-acetilcolina, N-acetilglicina, etc (DRICKAMER, 2006). As ficolinas estão presentes em vertebrados e invertebrados. As ficolinas humanas são atuantes no sistema imune e se ligam à superfície dos patógenos, podendo atuar também como opsoninas promovendo a fagocitose dos patógenos por neutrófilos (ENDO *et al.*, 2011). A figura 11 mostra a estrutura tridimensional de uma ficolina humana a Ficolina-2 com domínio tipo fibrinogênio complexado com diferentes ligantes. A análise estrutural dessa molécula mostra a localização do sítio de ligação ao grupo acetil, denominado S1, e a presença de outros três sub-sítios de ligação, denominados de S2, S3 e S4, que permitem a interação com ligantes acetilados menores (S2 e S3) e a interação com glicanos mais longos (S3 e S4). A figura 11 B mostra a similaridade na ligação entre a região S3 da lectina e os grupos sulfato, fosfato e N-acetil.

Figura 11: Estrutura tridimensional da Ficolina-2.



Fonte: Adaptado de LAFFLY *et al.*, 2014. A) Estrutura tridimensional da Ficolina-2 (PDB: 4R9T) com detalhes dos sítios de ligação S1, S2, S3 e S4. B) Interação de diferentes tipos de ligantes no sítio de ligação S3 da Ficolina-2.

Lectinas Tipo-M

As lectinas do Tipo-M estão intimamente relacionadas com as α -manosidases do retículo endoplasmático e sua função está associada ao controle de qualidade e degradação de glicoproteínas N-glicosiladas e a aceleração desse processo. No entanto, essas proteínas não possuem em sua sequência nem os aminoácidos nem as pontes dissulfeto responsáveis pela atividade catalítica da enzima, ou seja, essas lectinas se ligam aos glicanos de manose de glicoproteínas do lúmen do RE, mas não possuem atividade catalítica. O domínio de ligação a carboidrato de lectinas do Tipo-M é uma estrutura de barril formada por duas hélices alfa e folhas beta (DRICKAMER, 2006; GUPTA, 2012).

Lectinas F-box

As lectinas F-box são responsáveis por manter a homeostase de glicoproteínas no sistema, permitindo sua degradação pelo RE quando ocorre o enovelamento incorreto, por ser capaz de reconhecer especificamente N-glicanos presentes em glicoproteínas (MIZUSHIMA *et al.*, 2004). Recentemente foi proposto o mecanismo de seleção de glicoproteínas pelas lectinas F-box demonstrando sua seletividade por proteínas com falhas no enovelamento (YOSHIDA; TENAKA, 2010). As proteínas do tipo F-box geralmente possuem uma estrutura dividida entre a região de N-terminal contendo o motivo F-box, que consiste em 50 resíduos

de aminoácidos, e a região C-terminal que interagem com o substrato, sendo a função das proteínas tipo F-box de ligar-se a proteínas alvo (WINSTON *et al.*, 1999; KIPREOS; PAPAGO, 2000). No entanto, ainda não está totalmente esclarecido como ocorre o reconhecimento dessas proteínas alvo. Alguns estudos propõem que a fosforilação é um requisito para esse reconhecimento. Por se ligar a diversos substratos, as proteínas tipo F-box exercem um controle sobre a estabilidade de proteínas e a regulação de uma gama de processos celulares como o desenvolvimento de tecidos, proliferação celular e a morte celular, como já foi demonstrado em *Drosophila* sp. (HO *et al.*, 2006).

Lectinas tipo R

As lectinas do tipo R são as lectinas encontradas em diversos animais que se assemelham à lectina tóxica vegetal Ricina. Essas proteínas são classificadas no banco de dados de enzimas carboidratos ativas CAZy (*carbohydrate-active enzymes database*). Esse banco de dados descreve as famílias estruturalmente relacionadas pelas propriedades catalíticas e de ligação a carboidrato ou domínios funcionais de enzimas que degradam, modificam ou criam ligações glicosídicas.

Estruturalmente esta enzima é formada pela subunidade catalítica, a cadeia A, formada por oito hélices alfa e oito folhas beta e a cadeia B que possui o domínio lectínico, que possui dois domínios de ligação a carboidrato em *tandem* separados por aproximadamente 35 Å. Cada domínio tipo R contém uma organização de três lóbulos com o enovelamento tipo β trevo. Os três lóbulos são denominados de α , β e γ que são dispostos em um eixo triplo. Supostamente cada lóbulo poderia ser um local capaz de se ligar a carboidratos, no entanto, na maioria dos casos das lectinas do tipo R apenas um ou dois desses lóbulos contêm a sequência de aminoácidos conservados capaz de ligar ao açúcar (GUPTA, 2012).

Kaliklectinas

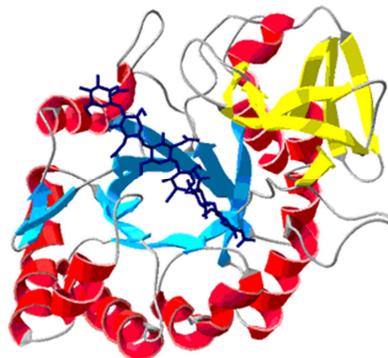
Em 2011, Tsutsui e colaboradores publicaram um trabalho sobre a descoberta de uma nova classe de lectinas chamada de Kaliklectinas, a partir da purificação e caracterização de uma lectina do muco da pele do peixe *Platycephalus indicus*. Esta proteína foi chamada de FHL (*FlatHead lectin*) e mostrou ser dependente de cálcio, específica a manose e homodimérica com

ponte dissulfeto entre as duas subunidades de 40kDa. A FHL não apresentou homologia a nenhuma outra classe de lectinas, mas apresentou 20% de identidade com as proteínas já conhecidas calicreínas e fator de coagulação XI de mamíferos e de *Xenopus laevis*. Essas proteínas são conhecidas por serem proteases serínicas que atuam no sistema hormonal e no sistema de coagulação sanguínea. No entanto, eles descobriram que a FHL não possuía o domínio de protease serínica, mas possuía região homóloga ao domínio de cadeia pesada da calicreína e do fator de coagulação XI, sugerindo que essa proteína não era uma enzima, mas sim um novo tipo de lectina animal.

Lectinas tipo Quitinase

Outro grupo de lectinas animais é o formado por proteínas tipo Quitinase, que apesar de serem semelhantes à enzima quitinase, estas não possuem a porção catalítica. São proteínas solúveis, intracelulares ou secretadas que apresentam estrutura semelhante a um barril triose-fosfato isomerase exemplificado na figura 12. Apesar dos mamíferos não produzirem quitina, eles produzem uma pequena quantidade de quitinases que aparentemente estão envolvidas no sistema imune inato (DRICKAMER, 2006).

Figura 12: Estrutura de barril da proteína YKL-40.



Fonte: PDB: 1HJW. Domínio TIM com o detalhe para as folhas beta em azul e amarelo e a molécula de GlcNAc em azul escuro.

Lectinas ligantes a Ramnose

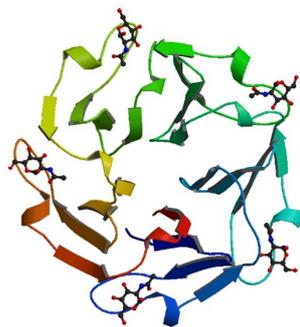
As lectinas ligantes a ramnose, ou RBL (*L-rhamnose binding lectin*) se ligam especificamente a L-Ramnose ou D-Galactose, sendo encontrada em peixes, ouriços, ostras e ascídias. Estas proteínas são capazes de aglutinar bactérias gram-negativas e gram-positivas e

atuam como um importante componente do sistema inato, sendo denominadas como proteínas de reconhecimento de padrões (PRP – *Pattern recognition proteins*) por atuar no reconhecimento de padrões bioquímicos não próprios, ou seja, padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs – *Pathogen-associated molecular pattern*) (KILPATRICK, 2002).

Tachylectinas

As lectinas da família Tachylectinas possuem cinco ou seis domínios repetidos contendo em torno de 35 resíduos em cada. São capazes de se ligar a lipopolissacarídeos sendo sua provável função relacionada à defesa. Foram inicialmente descritos a partir do isolamento de lectinas do carangueijo *Tachypleus tridentatus*. Um exemplo dessa lectina é a Tachylectina-1 que é formada por seis domínios com total de 232 resíduos, não é glicosilada e possui em sua estrutura um átomo de zinco. A Tachylectina-2 foi isolada também do carangueijo *Tachypleus tridentatus* e possui 236 resíduos de aminoácidos, sendo específica por N-acetilgalactosamina e a N-acetil glicosamina. A Thachylectina-2 é a primeira lectina a exhibir uma estrutura de folhas beta antiparalelas em forma de W com arranjo formando um túnel com moléculas de água no centro, como mostra a figura 13.

Figura 13 – Estrutura tridimensional da lectina Tachylectina-2 isolada de *Tachypleus tridentatus*.



Fonte: PDB: 1TL2

Espermadesinas

As espermadesinas são proteínas encontradas no plasma seminal capazes de reconhecer glicanos que se encontram na superfície celular. Essas lectinas possuem baixo peso molecular, entre 12 a 16 kDa, e todas possuem em suas sequências de aminoácido o domínio CUB, no entanto não apresentam similaridade de sequência com nenhum domínio de ligação a carboidrato já conhecido, indicando que essas proteínas formam um novo grupo de lectinas animais (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Estudos mostram que essas proteínas possuem afinidade para glicosaminoglicanos tipo heparina secretados pelo epitélio do trato reprodutor feminino, o que indica sua atuação no processo de capacitação espermática (SOLIS *et al.*, 1998; TIENTHAI *et al.*, 2000). Além disso, sua afinidade pelas glicoproteínas da zona pelúcida sugere a atuação das espermadesinas na interação entre gametas (SANZ *et al.*, 1993; JONAKOVA *et al.*, 1998; TICHA *et al.*, 1998). Essas lectinas são capazes também de se ligarem a heparina, inibidores de proteases, fosfolipídeos, possuindo assim uma variedade de atividades biológicas. As espermadesinas já foram identificadas em plasma seminal de diversos animais domésticos sendo atualmente já caracterizadas as de bovinos, suínos, equinos, ovinos e caprinos.

1.4 Caramujo *Achatina fulica*

O caramujo-gigante-africano *Achatina fulica* (FIGURA 14) é um molusco terrestre pertencente ao Filo Mollusca, da Classe Gastropoda, Ordem dos Pulmonata, Família Achatinidae, Gênero *Achatina* e foi introduzido ilegalmente no sul do Brasil em uma feira agropecuária, no final da década de 1980, como uma alternativa para a criação de “escargot” (*Helix aspersa*), (TELES; FONTES, 2002) comida muito apreciada pela culinária francesa. No entanto, a carne de *A. fulica* não obteve aprovação dos consumidores brasileiros provocando a desistência na criação e a soltura inadequada do molusco no meio ambiente, facilitando sua disseminação, em função de suas características biológicas como alta taxa de reprodução, fácil adaptação em diferentes ambientes e ausência de predadores naturais (PACHECO, 1998).

Figura 14 – Caramujo da espécie *Achatina fulica*.



Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Caramujo-gigante-africano>

Hoje essa espécie é considerada uma das cem piores espécies invasoras do mundo causando sérios danos ambientais e econômicos (LOWE *et al.*, 2006; REIBMAN *et al.*, 2010) já tendo sido disseminado na Índia, Madagascar, Tailândia, China, Ilhas do Pacífico, Austrália, Japão e pelo continente americano (VASCONCELLOS; PILE, 2001). No Brasil, o caramujo africano ocorre em populações elevadas nas áreas urbanas de vários municípios dos 23 estados (TELES; FONTES, 2002; THIENGO *et al.*, 2007).

O molusco *Achatina fulica* quando adulto possui sua concha medindo de 10 a 15 cm de comprimento com coloração marrom claro e escuro e podem pesar até 200 g. Já os indivíduos jovens se diferenciam apenas pelo tamanho, possuindo a mesma coloração na concha. Essa espécie é extremamente prolífera, principalmente na estação chuvosa, alcançando a maturidade sexual do 4º ao 5º mês e a fecundação ocorre cruzada (mutuamente), já que os indivíduos são hermafroditas. Podem realizar até 4 posturas ao ano com 50 a 400 ovos por postura, que medem de 5-6 mm de comprimento por 4-5 mm de largura com coloração branco-leitosa ou amarelada (TOMIYAMA; MIYASHITA, 1992; TOMIYAMA, 1994).

Quanto aos hábitos alimentares, caracteriza-se por ser um herbívoro generalista/políforo podendo alimentar-se de folhas, flores, frutos, casca caulinar, etc. de mais de 500 espécies de plantas, além de se alimentar também de papéis e até de tinta de parede. Eles podem também se tornar canibais comendo ovos e os jovens da mesma espécie, principalmente na falta de cálcio (CASSO-LOPES, 2007).

Para manter o equilíbrio hídrico esse caramujos são capazes de absorver ou liberar água através da pele dependendo do clima. Eles podem fazer uso da hibernação quando a temperatura está abaixo de 17° C ou acima de 38°C (SIMKISS; WILBUR, 1977).

Nessa fase de latência os caramujos produzem uma membrana chamada de epifragma, que além de proteger contra o ressecamento, predadores e patógenos, previne que durante a latência o caramujo seja enterrado com a concha virada para baixo. (STRUTHERS *et al.*, 2002).

Após a morte dos caramujos a concha geralmente fica virada para cima podendo ficar cheia de água da chuva e servir como criadouro para as larvas do mosquito *Aedes aegypti* e outros mosquitos, o que aumenta ainda mais a preocupação dos órgãos governamentais na busca de tentativas de controle deste animal.

1.5 Propriedades do muco de *Achatina fulica*

Nos moluscos terrestres pulmonares a liberação do muco ocorre por secreção apócrina (OLSEN; LUCHETEL, 1998) sendo esta composta por uma mistura de substâncias provenientes de várias glândulas cutâneas (SIMKISS; WILBUR, 1977). As glândulas pediosas são as principais produtoras do muco.

Nos animais a principal função biológica natural do muco é a de proteção das células da superfície exposta ao ambiente externo e é também crucial para a defesa e locomoção dos caracóis, ajudando a evitar danos mecânicos durante o movimento. Além disso, devido à sua viscosidade ele pode auxiliar em diversas funções como na captura de alimento, reprodução e proteção contra o ressecamento ao prevenir a evaporação da umidade da superfície do animal. O muco expressa informações sobre o estado sexual dos animais e a direção para a locomoção (SKINGSLEY *et al.*, 2000). O principal constituinte do muco gastrópoda é um complexo de proteínas e polissacarídeos e esse complexo é usualmente classificado numa ampla categoria de mucopolissacarídeos e glicoproteínas (LINCOLN *et al.*, 2004).

Na Europa, o muco é utilizado na produção de xaropes expectorantes e diversos cosméticos são produzidos a partir das propriedades dos compostos presentes. O conhecimento das aplicações terapêuticas e cosméticas do muco de caracóis provém dos primórdios da humanidade. Na Idade Média, a água da fervura dos caracóis era utilizada para a cura de doenças gastrointestinais, dores de garganta e bronquite. Antigamente o muco era utilizado na cura de úlcera gástrica e para o tratamento de estrias em mulheres após o parto e para atenuar manchas de cicatrizes (MARTINS *et al.*, 2003).

Estudo mais recentes mostram que o muco de *Achatina fulica* realmente possui atividades terapêuticas interessantes. Em 2007, Tempone mostrou que a secreção cutânea do caramujo gigante africano é fonte de compostos com atividade anti-Leishmania. Deste muco já foram estudadas e purificadas diversas moléculas, entre elas um fator antibacteriano (IGUCHI *et al.*, 1982) que é ativo tanto contra bactérias gram-positivas quanto gram-negativas e por isso auxilia nos processos de reparo das feridas pois a infecção constitui a causa mais importante do retardo da cicatrização (COTRAN *et al.*, 2000). Em 2003, Martins mostrou a capacidade cicatrizante do muco de *A. fulica* em lesões induzidas cirurgicamente em epitélio de coelho. Sírio (2005), Lorenzi (2006) e Da Silva (2009) mostraram que os caramujos dessa espécie possuem a capacidade de absorver as propriedades dos alimentos que ingerem, sendo essas propriedades mantidas tanto no muco quanto nos ovos. Foram feitos estudos com o muco após a alimentação dos caramujos com plantas medicinais e própoles e foi observado o aumento da atividade cicatrizante.

1.6 Proteínas isoladas de *Achatina fulica*

Existem atualmente na literatura trabalhos publicados sobre a purificação de lectinas tanto secretadas no muco (IGUCHI *et al.*, 1985; MITRA *et al.*, 1988; ITO *et al.*, 2011) quanto na glândula albumina (SARKAR *et al.*, 1984) e na hemolinfa (INDRA *et al.*, 2000), além de diversos trabalhos que falam sobre um fator antibacteriano presente no muco (IGUCHI *et al.*, 1982; KUBOTA *et al.*, 1985; FUCHINO *et al.*, 1991; OBARA, *et al.*, 1992; EHARA *et al.*, 2002;).

O primeiro trabalho sobre o isolamento de uma lectina presente no muco do caramujo *A. fulica* foi publicado em 1985 por Iguchi e colaboradores. Este grupo obteve uma lectina de 78 kDa, que aglutina eritrócitos humanos, é dependente de cálcio e se liga ao ácido N-acetilneuramínico, GalNAc e GlicNAc. O segundo trabalho publicado sobre uma aglutinina também presente no muco foi de Mitra e colaboradores em 1988. O grupo isolou uma proteína de 70 kDa, que aglutina eritrócitos humanos e se liga especificamente a β glicosídeos de D-Gal e D-GalNAc. Uma última lectina de alto peso molecular (350 kDa) foi purificada por Ito e colaboradores em 2011.

Embora no trabalho publicado por Obara e colaboradores (1992) sobre a clonagem da proteína antibacteriana presente no muco tenham citado como protocolo de purificação o trabalho publicado por Iguchi em 1985 sobre a lectina que reconhece ácido

siálico, os autores chamam a proteína de achacin, publicada posteriormente por Ehara e colaboradores (2002) como uma enzima do tipo L-Aminoácido oxidase.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo purificar uma lectina do muco de *Achatina fulica*, caracterizá-la físico-quimicamente, avaliar o uso dessa lectina como uma ferramenta biotecnológica, analisar sua toxicidade e suas atividades biológicas em modelos de inflamação, nocicepção e cicatrização.

2.2 Objetivos Específicos

- Purificar uma lectina presente no muco de *Achatina fulica*;
- Determinar a especificidade da lectina por açúcares e sua massa molecular aparente;
- Caracterizar físico-quimicamente a lectina em estudo por métodos clássicos de química de proteínas;
- Avaliar seu efeito tóxico;
- Avaliar o potencial anti-inflamatório da lectina do muco de *Achatina fulica*;
- Avaliar o potencial anti-nociceptivo da lectina do muco de *Achatina fulica*;
- Avaliar o potencial cicatrizante da lectina do muco de *Achatina fulica*;

**CAPÍTULO II - PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
UMA LECTINA DO MUCO DE *Achatina fulica* Bowditch 1822**

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos animais e coleta do muco

Os caramujos da espécie *Achatina fulica* foram coletados na Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza - Ceará principalmente durante o período chuvoso entre os meses de Março e Abril e eventualmente durante outros meses em locais úmidos como na beira do açude do Campus do Pici. Os animais foram coletados com o auxílio de luvas e lavados com água corrente para retirar areia e resíduos. Posteriormente, foram colocados em aquário com o fundo coberto com areia autoclavada para evitar a presença de fungos e bactérias além de deixar o meio mais estéril possível. Para os animais foi ofertado água e comida a vontade. Os animais eram alimentados de 2 em 2 dias com uma espécie de ração feita de mistura de fubá e casca de ovo macerada alternados com pedaços de chuchu (HAYASHI *et al.*, 2005).

Após um período de aclimação de três dias os caramujos foram lavados com água e, para a obtenção do muco, os animais foram estimulados suavemente com o auxílio de uma espátula na região dos pés, o que provocou a retração do pé e liberação do muco. Cerca de 100 mL foram obtidos utilizando 12 caramujos de tamanho médio.

3.2 Purificação da lectina do muco de *A. fulica* em cromatografia de interação hidrofóbica em gel de PhenilSepharse

Após a coleta, o muco foi diluído em duas vezes o volume de água destilada e deixado em agitação por 4 horas. Posteriormente foi centrifugado a 9.000 g por 20 minutos a 4°C e filtrado para separar de qualquer porção não solúvel. Para purificação da lectina foi utilizada a cromatografia de interação hidrofóbica em gel de PhenilSepharse, e para isso foi medido o volume do extrato obtido após a centrifugação e adicionado uma massa de Sulfato de Amônio para que a solução ficasse a 1M. O tampão utilizado para equilibrar a coluna e também a retirada do pico não retido foi Tris-HCl 50 mM pH 7.6 com 1M de Sulfato de Amônio e 5 mM CaCl₂ e o tampão utilizado para a retirada do pico retido foi Tris-HCl 50 mM pH 7.6 com 5 mM CaCl₂. A cromatografia foi monitorada pela absorvância de 280 nm e os tubos de maior absorvância foram reunidos e dialisados contra água destilada, sendo as duas últimas trocas feitas com água Milli-q.

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para avaliar a pureza da proteína obtida após cada passo de purificação foram feitos geis de poliacrilamida em condição desnaturante, com uso de β -mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio, e condição não desnaturante seguindo a metodologia de Laemmli (1970). Para isso a montagem do gel foi feita com gel de empilhamento a uma concentração de 4% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e gel de separação a uma concentração de 10% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8. O tampão de amostra utilizado para ressuspender as amostras liofilizadas das lectinas a uma concentração final de 4 mg.mL⁻¹ foi composto de Tris-HCl 0,08 M em pH 6,8 contendo glicerol a 5%, SDS a 2%, β -ME a 5% e azul de bromofenol a 0,05%. Além da desnaturação química as amostras sofreram desnaturação térmica pelo aquecimento a 100°C por 5 minutos. Aliquotas de 10 a 15 μ L foram aplicadas nos poços do gel de empilhamento e em um dos poços foi aplicado um marcador molecular composto de proteínas de massas moleculares aparentes conhecidas. A corrida eletroforética ocorreu a 20 mA com 120 V e o gel foi corado com solução de Croomassie Brilliant Blue R-250 a 1% de metanol: ácido acético e água (40:10:60, v/v/v). Para descorar o gel foi utilizada a solução descorante composta por metanol : ácido acético : água (40:20:40 v/v/v).

3.4 Detecção da Atividade Hemaglutinante

A Atividade Hemaglutinante do extrato e dos picos obtidos pelas cromatografias foi realizada utilizando sangues de coelho e sangue humano dos tipos A, B e O, todos tratados e não tratados com as enzimas papaína e tripsina em uma adaptação ao protocolo descrito por Moreira e Perrone (1967). Os testes foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços de fundo V. Inicialmente foram adicionados 50 μ L de tampão Tris-HCl 0,1M com 0,15M de NaCl a pH 7,6 em cada poço, seguido de diluições seriadas em duplicata de 50 μ L das amostras (1:2, 1:4, 1:8...). Após a diluição foram adicionados 50 μ L de suspensão de eritrócitos a 3% em 0,15M de NaCl e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. A observação da aglutinação foi feita macroscopicamente a olho nu, sendo o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH.mL⁻¹) definido como o inverso da maior diluição da amostra que apresentou nítida aglutinação.

3.5 Dosagem de proteínas solúveis

A quantificação do teor de proteínas solúveis foi medida a partir do protocolo feito por Bradford em 1976. Esse método consiste em adicionar 2,5 mL do reagente de Bradford a cada 100 μL de amostra. A mistura foi então deixada em repouso por cerca de 10 minutos e em seguida teve sua absorvância a 595 nm determinada em um espectrofotômetro de luz visível (VIS LBK Novaspec II, Pharmacia). Para a análise das concentrações de proteínas nas amostras foi feita uma curva padrão obtida com o uso de soluções de albumina sérica bovina (BSA) com concentrações conhecidas.

O teste de dosagem proteica solúvel foi realizado a cada passo de purificação da lectina com o objetivo de quantificá-la e, juntamente com o resultado obtido pelo teste de Atividade Hemaglutinante, verificou o avanço da Atividade Específica.

3.6 Cálculo da Atividade Específica

A Atividade Específica é o parâmetro medido que demonstra qual amostra possui maior quantidade da proteína em estudo. Para isso se faz necessário os dados obtidos na Atividade Hemaglutinante (A.H.) e na dosagem de proteínas solúveis.

O cálculo foi feito dividindo-se o título de hemaglutinação (UH.mL^{-1}) pela dosagem de proteínas solúveis (mgP.mL^{-1}), obtendo-se um valor em UH.mgP^{-1} (unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína).

3.7 Avaliação da inibição da atividade hemaglutinante por açúcares

Para avaliar a quais açúcares a lectina possui afinidade foi realizado o teste de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares, ou seja, quanto maior é a interação do carboidrato com a lectina e esta deixa de se ligar aos açúcares da superfície das hemácias e sua atividade hemaglutinante é inibida. Neste teste foi utilizada a concentração de lectina capaz de causar 4 UH. Foram utilizados diferentes tipos de açúcares nas concentrações de 0,1M e no caso de glicoproteínas a 5 mg.mL^{-1} , sendo estes açúcares simples ou glicoproteínas listados a seguir: D-Manose, D-Glicose, GlicNAc, GalNAc, α -Lactose, β -Lactose, D-Galactose, Metil- α -D-Galactopiranosídeo, N-Acetil- β -D-Manosamina, Mucina, Manitol,

Sucralose, Fucose, Arabinose, Ribose, Xilose, Neu5Ac e KDN. Nesse teste foram diluídos em duplicata 25 μL de cada açúcar serialmente em Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 com NaCl 0,15 M e 3 mM CaCl_2 . Ao final, foram adicionados 25 μL da fração selecionada em uma diluição anterior àquela certificada como maior diluição em que é possível verificar a atividade hemaglutinante a olho nu. Este ensaio foi feito em placa de 96 poços com fundo em V e deixado em repouso à temperatura ambiente durante um período de 1 hora. Após este tempo, foram adicionados 50 μL de eritrócito do melhor tipo sanguíneo verificado com o teste de atividade hemaglutinante e novamente a placa foi deixada em repouso por mais 1 hora e detectada a atividade inibitória.

A inibição da Atividade Hemaglutinante pelos açúcares foi determinada quando ocorre ausência de hemaglutinação. Além disso, foi também verificada a maior diluição em que se permaneceu a ausência de A.H, ou seja, qual é a menor concentração de tais açúcares que são capazes de inibir a lectina. Com os dados da atividade hemaglutinante e da atividade de inibição foi calculado o MIC - Mínima Concentração Inibitória dos açúcares.

3.8 Caracterização físico-química da lectina AFL

3.8.1. Teste de dependência a metais

Para determinar se a lectina AFL é dependente de metal, foi avaliado o efeito da adição e retirada dos íons divalentes sobre a atividade hemaglutinante. Para o teste 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ da lectina foi dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com 0,15 M e 25 mM de EDTA e foi realizado a atividade hemaglutinante para avaliar se a lectina perde atividade na ausência de metais. Posteriormente a lectina na concentração de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi novamente solubilizada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com 0,15 M NaCl e dialisada contra EDTA e posteriormente dialisado contra NaCl 0,15 M e a atividade hemaglutinante foi determinada. Com essa lectina pós dialise foi realizado a atividade hemaglutinante com tampão Tris contendo os íons: Cálcio, Manganês e os dois juntos sendo estes colocados nos tampões: Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com 0,15 M e 5 mM de CaCl_2 , Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com 0,15 M e 5 mM de MnCl_2 e Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com 0,15 M e 5 mM de CaCl_2 e 5 mM de MnCl_2 .

Após fazer a diluição seriada nos respectivos tampões os eritrócitos a 2% foram adicionados e a atividade hemaglutinante verificada. Após esse teste e comprovada a

dependência de cálcio para uma melhora na atividade lectinica da AFL, passou-se a utilizar CaCl_2 nos tampões durante os experimentos.

3.8.2 Teste de estabilidade a diferentes pHs

Para avaliar o efeito do pH na atividade hemaglutinante da lectina purificada do muco de *Achatina fulica*, 1 mg.mL^{-1} da lectina foi solubilizado em 0,15M de NaCl e 3mM CaCl_2 e deixada incubando por 1 hora em 8 soluções tampões na concentração de 0,1 M com diferentes pH cada, acrescidas de 0,15 M NaCl e 3 mM CaCl_2 :

pH 2,6 – Glicina;

pH 4,0 e pH 5,0 – Acetato de sódio;

pH 6,0 – Citrato de sódio;

pH 7,0 – Fosfato de sódio;

pH 8,0 – Tris- HCl

pH 9,0 e 10,0 – Glicina.

Após o tempo de incubação de 1 hora foram adicionados os eritrócitos e deixados incubando à temperatura ambiente por 45 minutos. Posteriormente, a atividade hemaglutinante foi determinada.

3.8.3 Teste de estabilidade a diferentes temperaturas

A análise do efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante da lectina purificada do muco de *Achatina fulica* foi realizada aquecendo a solução de 1 mg.mL^{-1} da lectina em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.6 com 0,15M de NaCl e 5 mM CaCl_2 e incubado por 1 hora nas temperaturas: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C. Após o período de incubação a solução foi centrifugada e a atividade hemaglutinante foi realizada.

3.9 Análise de glicosilação

Para avaliar se a lectina é uma glicoproteína foi realizada a quantificação de carboidrato pelo método de Dubois (1956), também conhecido como método do Fenol –

Ácido Sulfúrico. Para isso 0,5 mL da proteína a uma concentração final de 1 mg.mL^{-1} em água ultra pura foi misturada a 0,5 mL de fenol 5 % e em seguida foi adicionado lentamente 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A leitura da absorbância a 490 nm em espectrofotômetro foi feita após 30 minutos da reação em contato. Para comparação foi utilizada uma curva padrão com diferentes concentrações de uma solução de glicose. A partir dessa leitura é possível estimar a porcentagem do teor de carboidrato presente na proteína.

Para avaliar se a lectina é uma glicoproteína esta foi submetida à análise de glicosilação pela reação de Schiff (ZACHARIUS *et al.*, 1969). Para isso foi feita uma eletroforese SDS-PAGE 10 % em que o gel, após a corrida, foi fixado por uma hora em ácido acético 7,5 % e em seguida reagiu com o ácido periódico 0,2 % por mais uma hora. Logo após o gel foi corado com o reagente de Schiff por mais uma hora. Uma solução de metabissulfito de sódio 0,5 % em HCl 0,05M foi utilizada para retirar o excesso de corante do gel. A coloração rosa no gel indica se a proteína possui a presença de glicanos. Essa coloração é dada pela oxidação dos resíduos de hexoses produzindo aldeídos que reagem com reagente de Schiff, composto por fucsina básica diluída em HCl.

3.10 Ensaio de toxicidade com *Artemia* sp.

Apesar de tantas lectinas isoladas do muco desse caramujo, e das mesmas reconhecerem a açúcares importantes, nenhum trabalho até agora mostrou possíveis aplicabilidades biotecnológicas dessas lectinas, sendo este o principal objetivo do presente trabalho. Na busca de biomoléculas com propriedades farmacológicas é imprescindível a realização de testes de toxicidade que comprove a segurança de tal produto. Desta forma, estudos mostram que o modelo de ensaio de toxicidade utilizando *Artemia* sp. é um método confiável para a avaliação de toxicidade de amostras biológicas. A *Artemia* sp. (FIGURA 15) é uma espécie de microcrustáceo de água salgada comumente utilizada para alimentar peixes. Por ser de fácil manuseio, baixo custo e de fácil cultivo, esta espécie permite uma rápida análise dos ensaios e são utilizadas em análises preliminares de toxicidade geral (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Figura 15 – Foto de *Artemia* sp.



Fonte: <http://www.flickrriver.com/photos/chenhwen/2208595265/>

A *Artemia* sp. pertence ao filo Arthropoda, classe Crustacea, subclasse Branchiopoda, ordem Anostracata, família Artemidae e gênero *Artemia*. Para os testes de toxicidade devem ser utilizados animais no estágio de náuplios II, uma vez que no estágio de náuplios I os animais possuem reserva de vitelo não se alimentando com as substâncias presentes no meio, não validando os testes realizados nesta fase do desenvolvimento. Já na fase de náuplios II os animais se alimentam dos nutrientes do meio e sendo sensíveis a diversos tipos de substâncias, são viáveis para os testes de toxicidade (VEIGA *et al.*, 2002).

A utilização da *Artemia* sp. em estudos sobre a atividade toxicológica de produtos naturais e sintéticos vem aumentando desde 1985, quando o centro de Pesquisas e Desenvolvimento (CENPES) da PETROBRAS implementou o uso de *Artemia* sp. para a avaliação da toxicidade de produtos derivados do petróleo. Posteriormente, em 1992 o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) postulou que os fabricantes de dispersantes de óleos só receberiam o registro caso apresentarem o laudo de avaliação de toxicidade de seus produtos contra *Artemia* sp.

Este teste consiste em avaliar os efeitos sofridos por esses animais ao serem expostos a determinada substância em um período de 24 a 48 horas. Após este período é contado o número de animais vivos e mortos e analisado comportamentos incomuns quando comparado com a solução padrão sem a substância testada. Depois de feita a contagem é calculado a CL_{50} que representa o valor de concentração da substância capaz de matar 50% dos animais expostos a tal substância (BURATINI *et al.*, 2004), sendo desta forma possível se determinar os produtos que apresentam maior ou menor toxicidade.

A avaliação da toxicidade da lectina AFL foi realizada pelo teste de letalidade sobre náuplios estágio II de *Artemia* sp. Para isso, cistos de *Artemia* sp. a uma concentração de 1 g.L^{-1} , foram eclodidos em água do mar artificial a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob constante iluminação e aeração em um tubo cilindro cônico de polietileno. Após 24 horas a luz foi direcionada para o

fundo do tubo e a aeração foi suspensa. Isso facilita a obtenção dos náuplios saudáveis já que com o comportamento fototrófico estes migram na direção da luz se acumulando no fundo do tubo, enquanto os cistos que não eclodiram mantiveram – se na superfície (MELO, 2011).

Foi preparado uma solução da lectina AFL dissolvida em água do mar artificial a uma concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os testes foram conduzidos usando placas de Limbro® de 24 poços e os testes foram realizados em triplicata. Cada poço foi preenchido com 10 náuplios no estágio II, solução lectínica (3,5; 6,25; 12,5; 25; 50 ou $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e água do mar artificial totalizando um volume de 2 mL. Como controle negativo foram usados poços de 2 mL de água do mar contendo somente náuplios de *Artemia*. Após 24 e 48 horas de incubação, o número de náuplios mortos em cada poço foi contado e a LC50 foi determinado usando análise Probit, segundo descrito por Finney (1971).

3.11 Cromatografia de Exclusão Molecular

A partir da lectina purificada por interação hidrofóbica em coluna de PheniSephrose foi realizado uma cromatografia de exclusão molecular utilizando a coluna Superdex 200. A lectina liofilizada foi solubilizada no tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com NaCl 0,15M e 3 mM de CaCl_2 em uma concentração aproximada de 5 mg.mL^{-1} . Após solubilizada a lectina em solução foi centrifugada por 20 minutos a 9.000 g, filtrada e posteriormente aplicada na coluna Superdex 200 equilibrada com o mesmo tampão em fluxo de 0.2 ml.min^{-1} .

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Purificação da lectina nativa do muco de *Achatina fulica*

Inicialmente foi feita a retirada do muco, a aferição do volume coletado e a diluição em duas vezes o volume de água, para, posteriormente, esse extrato ser centrifugado. Em seguida foi realizada a atividade hemaglutinante do extrato do muco e o maior título de hemaglutinação foi obtido em sangue tratado com papaína e com título menor para sangue

tratado com tripsina e não tratado. A tabela 1 mostra os valores em Unidade Hemaglutinante. O tratamento enzimático dos eritrócitos com enzimas proteolíticas permite a quebra de proteínas da superfície da membrana celular dos eritrócitos, o que aumenta a exposição de outros glicanos também presentes no glicocálice. Dessa forma pode ocorrer o aumento da interação da lectina com os eritrócitos tratados (NAGANO *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Atividade hemaglutinante no extrato do muco de *A. fulica*

	Papaína	Tripsina	Nativo
Eritrócito de coelho	256	128	128

Fonte: Elaborado pela autora.

Para a atividade de inibição do extrato do muco foram utilizados 0,1M dos seguintes açúcares: Fucose, Carragenana, Mucina, Arabinose, Fetuina, GlicNAc, GalNAc, α -Lactose, β -Lactose, Galactose, Glicose, Metil- α -D-glicopiranosídeo, Fucoidano, p-nitrophenil-D-galactopiranosídeo e Sacarose. O resultado dos açúcares que inibiram a hemaglutinação do extrato do muco está detalhado na tabela 2.

Durante o processo de revisão bibliográfica foram observados e analisados os protocolos de purificação das outras lectinas já isoladas do muco do caramujo *Achatina fulica* (IGUCHI *et al.*, 1985; MITRA *et al.*, 1988; ITO *et al.*, 2011). Após a retirada do muco e diluição em duas vezes o volume de água, foram realizadas repetidas tentativas de obtenção da lectina a partir dos protocolos publicados. No entanto, o primeiro fato observado foi que a atividade de inibição realizada com o extrato mostrou perfil muito diferente das lectinas já purificadas, já que o extrato não apresentava afinidade à GalNAc nem à GlicNAc. Dessa forma não foi possível seguir o protocolo de purificação proposto por Iguchi e colaboradores (1985) que utilizou coluna de Sepharose 4B ligada covalentemente a N-acetil-D-glicosamina.

Tabela 2- Concentração Mínima Inibitória dos açúcares em extrato do muco de *A. fulica*

Açúcar	MIC em mM
Fucose	50
Arabinose	50
Galactose	25
Fucoidano	12,5
α -Lactose	12,5
β -Lactose	12,5
Fetuina	6,25
Mucina	Ø
Carragenana	Ø
Glicose	Ø
Metil- α -D-glicopiranosídeo	Ø
p-nitrophenil-D-galactopiranosídeo	Ø
Sacarose	Ø
GlicNAc	Ø
GalNAc	Ø

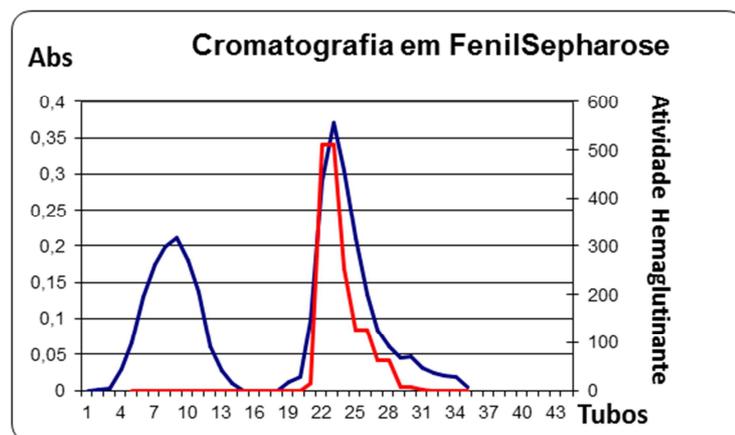
Os outros dois artigos que mostram a purificação de lectinas presentes no muco do caramujo *Achatina fulica* (MITRA *et al.*, 1988 e ITO *et al.*, 2011) também apresentam afinidade por GalNAc. Dessa forma foi observado que a tabela de inibição obtida experimentalmente era diferente das relatadas nos artigos. Entretanto, apesar dessa diferença de afinidade foram seguidos os protocolos propostos pelos artigos. Tanto a purificação por cromatografia de afinidade em mucina proposta por Mitra e colaboradores em 1988, quanto a troca iônica proposta por Ito e colaboradores 2011 não foram eficientes para o processo de purificação, caracterizando assim a existência de uma nova lectina, sendo necessário a criação de um novo protocolo de purificação.

Para a purificação da nova lectina o muco foi retirado e diluído em dois volumes de água e deixado em agitação por 4 horas. O novo protocolo de purificação utilizou a

cromatografia de interação hidrofóbica e por isso, após a agitação do extrato, foi adicionado Sulfato de Amônio para a concentração final de 1M. Foi então realizada a cromatografia em coluna de PhenilSepharose, onde o tampão utilizado tanto para equilibrar a coluna quanto para eluir o pico não retido foi Tris-HCl 50 mM pH 7.6 com 1M de Sulfato de Amônio e 5 mM CaCl₂ e para eluir o pico retido foi utilizado Tris-HCl 50 mM pH 7.6 com 5 mM CaCl₂. A obtenção da lectina e a atividade hemaglutinante de cada tubo da cromatografia estão mostradas na figura 16. Foi realizado um acompanhamento da atividade hemaglutinante em cada tubo coletado durante a cromatografia para avaliar se a lectina estava presente apenas no pico retido na coluna.

O pico que contém a lectina foi dialisado exaustivamente em água destilada, sendo as duas últimas trocas foram feitas com água Milli-q, e posteriormente a amostra foi liofilizada. A lectina purificada foi então a partir de agora chamada de AFL (*Achatina fulica* lectin).

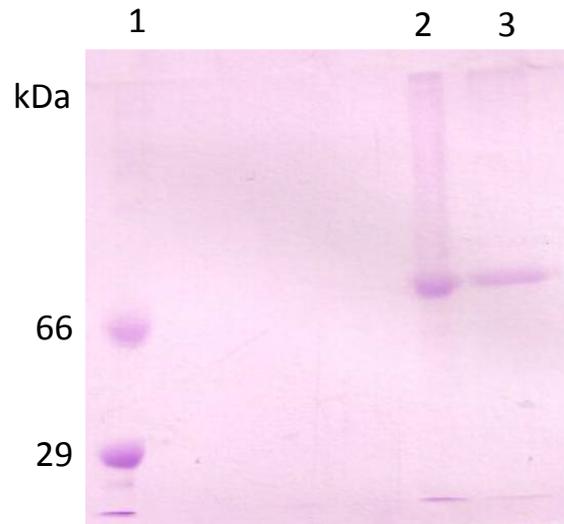
Figura 16 - Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de PhenilSepharose e atividade hemaglutinante dos picos da cromatografia.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para avaliar a pureza da proteína após a cromatografia foi realizada eletroforese SDS-PAGE 10% utilizando a lectina na concentração de 4 mg.mL⁻¹, sendo aplicado no gel amostra reduzida e não reduzida, como mostrado na figura 17. A eletroforese apresentou um grau de pureza favorável, validando o protocolo de purificação. A lectina possui massa molecular aparente de aproximadamente 70 kDa.

Figura 17- Eletroforese SDS-PAGE 10%.



Fonte: Elaborada pela autora. 1-Marcadores moleculares (BSA 66 kDa e Anidrase Carbônica 30 kDa); 2- AFL purificada não reduzida e 3- AFL purificada reduzida.

Ao comparar as bandas das amostras reduzida e não reduzida, é possível notar uma tênue marcação de uma banda na amostra reduzida com massa molecular aparente um pouco maior do que 70 kDa, de aproximadamente 75 kDa, acima da banda mais forte na amostra reduzida. Como essa banda não foi observada na amostra não reduzida, podemos inferir que se trata da própria proteína que se comporta dessa forma pela quebra de pontes dissulfeto intercadeias presente na estrutura, fazendo com que a conformação da proteína fique mais “frouxa”, aparentando um peso molecular maior do que a forma mais compacta quando as pontes dissulfeto ainda estão formadas. Dessa forma a proteína reduzida possui massa molecular aparente maior. O fato do gel apresentar duas bandas na forma reduzida deve-se possivelmente a uma redução não completa da proteína, apresentando na mesma corrida as formas reduzida e não reduzida.

Após a purificação da lectina, foi realizada a atividade hemaglutinante e a quantificação de proteína por método de Bradford da lectina purificada para a obtenção da atividade específica e posteriormente a comparação com o extrato do muco e assim avaliar o grau de pureza obtido. A quantidade de proteínas solúveis totais no extrato do muco foi de $0,396 \text{ mg.mL}^{-1}$ e a atividade específica foi de $646,464 \text{ U.H.mg}^{-1}$, já a quantidade de proteínas solúveis na fração da lectina purificada foi de $0,049 \text{ mg.mL}^{-1}$ e a atividade hemaglutinante específica foi de $20.770,8 \text{ U.H.mg}^{-1}$. Esse resultado comprova a alta capacidade de purificação do protocolo proposto, sendo a lectina purificada 32,13 vezes em relação ao extrato total do muco, como mostra a tabela 3.

Tabela 3 – Tabela de purificação da lectina do muco de *Achatina fulica*.

Fração	^{a)} Proteínas (mg.mL ⁻¹)	^{b)} U.H Total	^{c)} Atividade Específica (U.H.mg ⁻¹)	^{d)} Purificação
Extrato Total do muco	0,396	12.800	646,464	1
PII Hidrofóbica	0,049	6.144	20.770,8	32,13

Fonte: Elaborada pela autora.

- a) Concentração de proteínas por mL de solução determinada pelo método de Bradford (1976);
- b) Atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados com papaina, expressa em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H.);
- c) Atividade Hemaglutinante Específica calculada como a relação entre a atividade hemaglutinante e a concentração de proteínas;
- d) Purificação, calculada como a relação entre a atividade hemaglutinante específica do extrato total pela atividade específica da proteína após purificação em cromatografia de interação hidrofóbica

4.2 Caracterização Físico-Química AFL

4.2.1 Avaliação da dependência de Metais

Para avaliar se a atividade da lectina é dependente de algum íon metálico, foi realizado o teste de dependência a metais e nele foi caracterizado que a AFL é uma metaloproteína dependente de cálcio. Para chegar a essa conclusão, inicialmente foi realizada uma atividade hemaglutinante com a lectina diluída em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com 150 mM NaCl que continha EDTA e foi observado que esta perdeu toda a capacidade de aglutinar eritrócitos. Posteriormente a lectina foi dialisada contra EDTA e foi realizada novamente a atividade hemaglutinante que apresentou baixo título de hemaglutinação de apenas 4 U.H.. Em seguida, foram realizadas três atividades com a lectina dialisada contra EDTA. No primeiro foi adicionado somente o metal cálcio no tampão de diluição e foi visto que a lectina apresentou título de 128 U.H.. O segundo foi adicionando a mesma quantidade apenas de manganês não foi observado nenhum título de hemaglutinação. A comprovação de que a atividade da AFL é dependente de cálcio ocorreu ao realizar o terceiro teste com o tampão contendo os dois íons, cálcio e manganês. Neste teste foi visto que a atividade da lectina foi a mesma de quando adicionou apenas o íon cálcio, comprovando dessa forma a dependência exclusiva por cálcio. Os valores obtidos com essa atividade são detalhados na tabela 4. De acordo com o artigo de revisão sobre lectinas ligantes a ácido siálico (MANDAL; MANDAL,

1990), uma característica semelhante entre elas é a necessidade de íons de cálcio para suas atividades, sendo a presença deste íon também necessária durante o processo de purificação.

Tabela 4 – Atividade de dependência a metal da lectina AFL

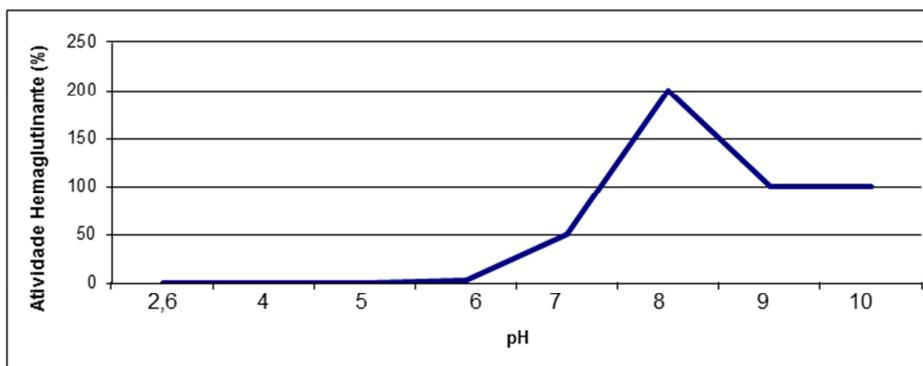
Amostra	Unidade Hemaglutinante
AFL purificada	512
AFL diluída com tampão contendo EDTA	Ø
AFL pós dialise contra EDTA	4
AFL pós dialise contra EDTA + Ca ⁺⁺	128
AFL pós dialise contra EDTA + Mn ⁺⁺	Ø
AFL pós dialise contra EDTA + Ca ⁺⁺ + Mn ⁺⁺	128

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Teste de estabilidade a diferentes pHs

No teste de estabilidade em diferentes pHs, a lectina foi testada em tampões de pH: 2,6; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10. O gráfico da figura 18 mostra que a AFL se mostrou ativa entre os pHs 6 e 10 sendo 8 o pH ótimo desta proteína, pois atingiu o valor máximo da atividade hemaglutinante ao comparar com os outros tampões.

Figura 18 – Gráficos de estabilidade a diferentes pHs da lectina AFL.

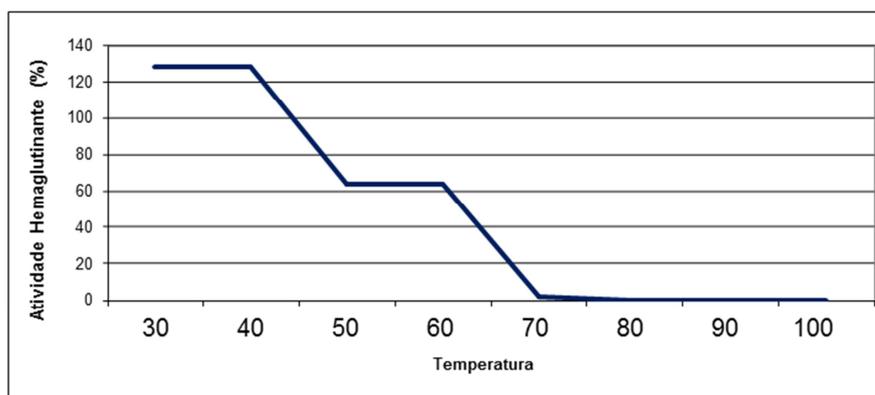


Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.3 Teste de estabilidade a diferentes temperaturas

Já no teste de estabilidade térmica a lectina foi deixada incubando por uma hora nas seguintes temperaturas em graus célsius: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100. A figura 19 mostra que a lectina é ativa e estável entre as temperaturas de 30° a 40°, perdendo gradativamente sua atividade entre as temperaturas de 45 até 60° até atingir a temperatura de 70°C e perder completamente a atividade.

Figura 19 – Gráficos de estabilidade a diferentes temperaturas da lectina AFL.

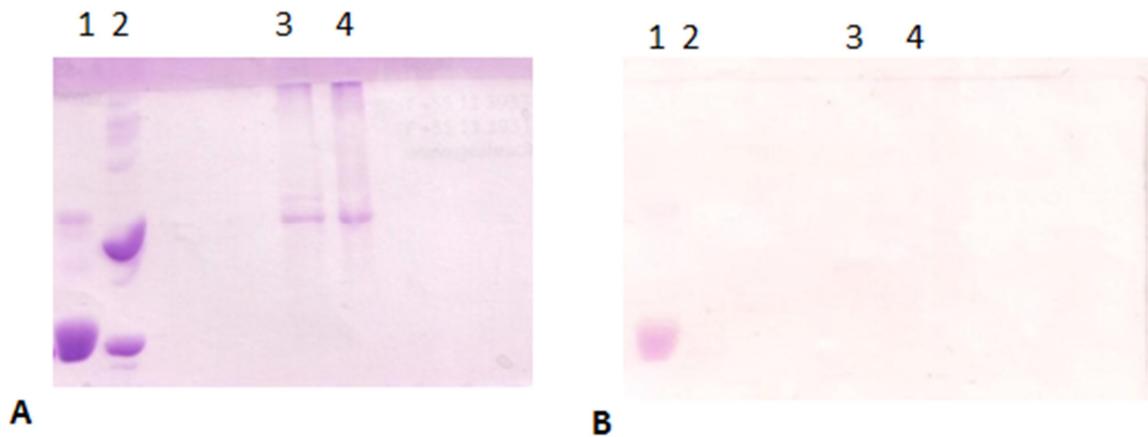


Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Análise de Glicosilação

Para avaliar se a lectina é uma glicoproteína foi realizado o teste do Fenol-Ácido Sulfúrico e duas eletroforese SDS-PAGE, sendo um gel corado com o reagente de Schiff e o outro com cromassie blue para a comparação. A quantificação de carboidrato pelo método do fenol-ácido sulfúrico mostrou que em 1 mg.mL⁻¹ de lectina purificada existem 0,461% de carboidrato, uma concentração muito baixa de carboidrato, o que justifica a ausência de bandas nítidas quando o gel é corado com o Reagente de Schiff mostrado na figura 20. Para as eletroforeses foram utilizados 4 mg.mL⁻¹ de lectina purificada. De acordo com a revisão sobre lectinas ligantes à ácido siálico, a maioria delas são glicoproteínas, exceto a lectina de ovo de sapo e a de gérmen de trigo (MANDAL; MANDAL, 1990).

Figura 20- Eletroforese SDS-PAGE 10% corada com Coomassie Blue Brillhant em A e com Reagente de Schiff em B.



Fonte: Elaborada pela autora. 1- Marcador contendo amostra com glicoproteína; 2- Marcador sem amostras com glicoproteína; 3- AFL reduzida 4- AFL não reduzida.

No gel de eletroforese corado com cromassie blue foi observado também a presença da segunda banda de massa molecular aparente maior na amostra reduzida, e a ausência da mesma banda na amostra não reduzida. Esse padrão de bandas permaneceu constante em todos os experimentos com essa lectina, não sendo este um artefato de preparo, mas sim algo referente à caracterização da proteína que deve ser levado em consideração para uma posterior análise mais detalhada.

4.4 Atividade Toxicológica contra *Artemia sp.*

Para avaliar a toxicidade da lectina purificada foi realizado o teste que avalia a capacidade da lectina matar náuplios de *Artemia sp.* A lectina foi dissolvida em água do mar artificial a uma concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os testes foram conduzidos usando placas de Limbro® de 24 poços. Cada poço foi preenchido com 10 náuplios na fase II, solução lectínica (3,5; 6,25; 12,5; 25; 50 ou $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e água do mar artificial totalizando um volume de 2 mL. Os testes foram realizados em triplicata e para o controle negativo foram usados poços de 2 mL de água do mar contendo somente náuplios de *Artemia*. Após o período de 24 e 48 horas de incubação, o número de náuplios mortos em cada poço foi contado. Foi observado que a lectina não foi capaz de matar os náuplios nem no período de 24h nem após 48h, já que o número de animais mortos não foi significativo nem tinha correlação com a concentração da lectina presente em cada poço como visto na tabela 5, que mostra o número de náuplios

mortos em relação ao número total de náuplios em cada poço em cada placa. Este resultado é muito importante já que se tem como objetivo deste trabalho avaliar e utilizar esta lectina como um produto biotecnológico. Além disso, este teste vem sendo utilizado desde 1985 quando a Petrobrás implementou seu uso para a avaliação da toxicidade de algumas substâncias, sendo este um teste padrão para a determinação da toxicidade de um produto.

Tabela5. Resultado da leitura do número de náuplios de *Artemia* sp. após 24 e 48 horas.

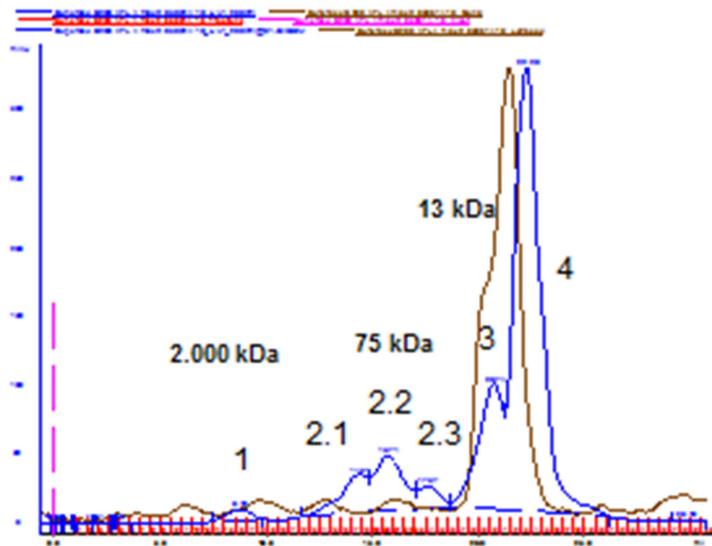
Placa1	c	100	50	25	12,5	6,25	3,15	} Leitura com 24h	
	1/10	1/10	0/12	0/12	1/12	1/10	2/14		
	0/10	0/11	0/10	0/13	0/9	0/11	0/10		
	0/10	0/12	0/12	0/10	1/12	0/10	0/11		
Placa2	c	100	50	25	12,5	6,25	3,15		
	0/12	0/10	1/11	1/10	0/12	1/11	2/14		
	0/10	2/14	2/13	2/15	0/14	0/12	2/16		
	0/10	1/10	1/12	1/11	1/13	1/11	4/18		
Placa1	c	100	50	25	12,5	6,25	3,15		} Leitura com 48h
	1/10	1/10	1/12	0/12	2/12	1/10	2/14		
	0/10	0/11	0/10	0/13	0/9	0/11	0/10		
	0/10	0/12	1/12	0/10	1/12	1/10	0/11		
Placa2	c	100	50	25	12,5	6,25	3,15		
	0/12	0/10	1/11	1/10	1/12	1/11	2/14		
	0/10	2/14	2/13	2/15	0/14	0/12	3/16		
	0/10	1/10	2/12	1/11	1/13	1/11	4/18		

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Cromatografia de Exclusão Molecular

Com o objetivo de se fazer uma análise mais fina sobre a massa molecular desta lectina foi realizada a cromatografia de exclusão molecular, em coluna de Superdex 200, utilizando a lectina purificada por interação hidrofóbica em coluna de Fenil Sepharose. A lectina liofilizada foi solubilizada no tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 com NaCl 150 mM e 3 mM de CaCl₂ em uma concentração aproximada de 5 mg.mL⁻¹. Depois de solubilizada a lectina em solução foi centrifugada por 20 minutos a 9.000 g e filtrada em membrana MilliporeTM. A proteína foi aplicada na coluna S200 equilibrada com o mesmo tampão em fluxo de 0,2 ml.min⁻¹. O perfil da cromatografia é visto na figura a seguir.

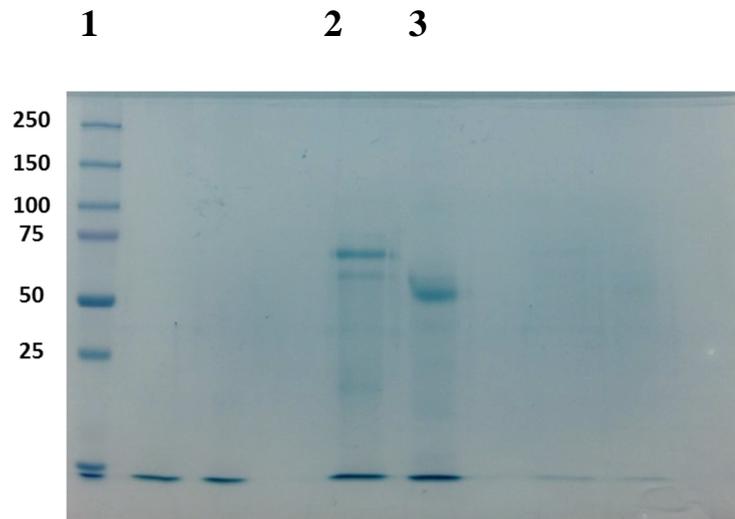
Figura 21 – Cromatografia de exclusão molecular em S200 da lectina AFL.



Fonte: Elaborada pela autora.

Após a cromatografia, os tubos referentes aos picos com peso molecular aproximado de 75 kDa foram coletados e concentrados por centrifugação em Amicon para posterior análise de pureza por SDS-PAGE. Neste gel foi observado o mesmo padrão nas amostras de proteína reduzida, de apresentar duas subunidades de massa molecular aparente maior do que quando a proteína está no estado não-reduzido, como mostrado na figura 22. Esse padrão se mostrou constante durante todos os experimentos, inclusive no segundo passo cromatográfico com a amostra saída da cromatografia de exclusão molecular. Este padrão pode ser explicado por pontes dissulfeto inter-cadeia presentes na proteína.

Figura 22 – Gel de eletroforese SDS-PAGE da proteína AFL purificada por cromatografia de exclusão molecular.



Fonte: Elaborada pela autora. Em 1- marcador, 2- AFL reduzida e 3- AFL não reduzida.

4.6 Ensaio de inibição por diferentes tipos de açúcares

Para uma análise refinada dos açúcares capazes de inibir a lectina AFL, foi realizado o teste de inibição com a lectina purificada pela cromatografia de exclusão molecular. Foi utilizada para esse teste a proteína purificada concentrada em Amicon até a concentração de 1 mg.mL^{-1} . Para o teste de inibição foram utilizados os seguintes açúcares: glicose, galactose, manose, lactose, fucose, arabinose, ribose, xilose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, Ácido neuramínico e KDN (Ácido deaminoneuraminico).

Comparando o resultado de inibição realizado com o muco extraído da *Achatina fulica* com os resultados de inibição da lectina purificada desse muco da tabela 6, vimos que o padrão da ausência de inibição por N-acetilglicosamina e N-acetilgalactosamina foi mantido, confirmando que se trata de uma nova lectina, diferente das isoladas em outros trabalhos (IGUCHI *et al.*, 1985; MITRA *et al.*, 1988). Foi também observado um aumento da atividade inibitória por lactose e galactose comparando com o resultado da atividade de inibição do muco, devido ao aumento da concentração da proteína purificada em relação ao extrato do muco.

No entanto, o que mais chamou atenção e corrobora com o alto potencial biotecnológico desta lectina é a capacidade de não somente reconhecer ácido siálico, mas também de reconhecer e se ligar de forma diferente a tipos diferentes de ácidos siálicos. Isto

foi provado pelo diferente grau de inibição da AFL em relação ao Ácido Nacetilneuraminico e ao outro ácido siálico KDN, também chamado de Ácido deaminoneuraminico. A AFL inibiu com MIC de 12,5 mM o Neu5Ac enquanto que mostrou maior interação com o KDN apresentando MIC de 6,25 mM.

Tabela 6 – Resultado da inibição da lectina AFL

Açúcar	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1	0.5
Lactose	-	-	-	-	-	-	+	+
KDN	-	-	-	-	-	+	+	+
Neu5Ac	-	-	-	-	+	+	+	+
Ribose	-	-	-	-	-	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	+	+	+	+
Glicose	-	-	-	+	+	+	+	+
Xilose	-	-	-	+	+	+	+	+
Fucose	-	-	+	+	+	+	+	+
Manose	-	+	+	+	+	+	+	+
GlicNAc	+	+	+	+	+	+	+	+
GalNAc	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = ocorreu aglutinação

- = não ocorreu aglutinação

Os ácidos siálicos são α -ceto ácidos formados por uma cadeia de 9 carbonos (ANGATA; VARKI, 2002) e estão envolvidos em processos biológicos como, por exemplo, nas funções de mediadores na adesão célula-célula, mediadores na comunicação intercelular, renovadores celulares, receptores para bactérias e vírus, entre outras (WILSON; VON ITZSTEIN, 2003; SEARS; WONG, 1999).

Estudos mostram que notáveis alterações na estrutura de oligossacarídeos são associadas a doenças humanas, entre elas o câncer (KIM; VARKI, 1997; HAKOMORI, 2002; LAU; DENNIS, 2008). De acordo com Akcay e colaboradores (2001) a superfície das células cancerosas difere em muitos aspectos das células normais. Uma dessas transformações está

associada com mudanças na composição da membrana celular, verificando-se alterações nas membranas em termos do conteúdo de ácido siálico, glicoproteínas e glicolípídeos. Nos processos tumorais o ácido siálico está envolvido na migração, invasão e potencial metastático (CHANG *et al.*, 2006).

Lectinas que se ligam especificamente à ácido siálico são potencialmente úteis na detecção, quantificação, localização, purificação e caracterização de várias biomoléculas que contém ácido siálico. Essas lectinas podem também ser usadas como sondas específicas para determinados derivados de ácido siálico, servindo como marcadores moleculares para fenômenos fisiológicos ou mesmo patológicos (MANDAL; MANDAL, 1990). Ao todo, mais de 100 lectinas já foram purificadas de plantas e de animais e dentre elas muito poucas são as que se ligam e reconhecem especificamente ácido siálico. A maior parte dessas lectinas foi identificada a partir de diversos invertebrados, algumas de hemolinfa, (BIRD, 1974; COHEN, 1984; GOLDSTEIN; PORETZ, 1986; YEATON, 1981a, 1981b) sendo dentre os grupos de invertebrados a maior ocorrência nos grupos de artrópode, molusca e urocordada (YEATON, 1981a). As lectinas ligantes a ácido siálico possuem a característica de necessitarem de íons de cálcio para suas atividades, sendo este também necessário e utilizado durante o processo de purificação. A maioria dessas lectinas possui alto peso molecular e geralmente contém mais de uma subunidade. É comum que essas lectinas se liguem tanto a diferentes derivados de ácidos siálicos como também podem se ligar a outros tipos de açúcares (MANDAL; MANDAL, 1990).

Um dos derivados de ácido siálico é o KDN, uma abreviação de ácido 3-desoxi-D-glicero-a-non-2-ulopiranosônico ou ácido deaminoneuramínico, ou seja, estruturalmente é o ácido neuramínico sem a porção de amina. Historicamente, a primeira ocorrência de KDN foi mostrada em algumas células e secreções de muco de vertebrados inferiores e em algumas espécies de bactérias. A expressão de KDN em glicoconjugados de células e secreções de animais assim como na parede celular de bactérias patogênicas sugere que essa expressão possa estar relacionada a um papel biológico e evolucionário. Essa super expressão de KDN pode refletir a deficiência ou desordem no mecanismo metabólico em células tumorais (INOUE; KITAJIMA, 2006). Estudos mostram a ocorrência de alta expressão de KDN em células vermelhas do cordão umbilical humano e em tumores malignos de ovário e de mama (INOUE *et al.*, 1998). Outro trabalho também relacionado com a presença de KDN em tumores mostra que além da alta presença de Neu5Ac em câncer de pâncreas, existe também uma alta concentração de KDN em câncer de próstata (YABU *et al.*, 2013). Dessa forma, a análise dos carboidratos presentes em células cancerígenas vem sendo amplamente utilizada

como uma ferramenta de grande importância na busca de novos marcadores moleculares tumorais (NARIMATSU *et al.*, 2009; ALLEY *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram a purificação de uma lectina do muco de *Achatina fulica*, dependente de cálcio, específica a lactose e que reconhece ácido siálico. Para a completa caracterização desta lectina purificada, serão necessários experimentos aprofundados da sequência de aminoácidos desta lectina, para que por homologia de sequência se possa comprovar a qual família de lectinas animais ela pertence ou se suas características podem iniciar um novo grupo de lectinas animais.

**CAPÍTULO III - ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-
NOCICEPTIVA DA LECTINA DO MUCO DE *Achatina fulica***

5. INTRODUÇÃO

5.1 Visão geral da Inflamação

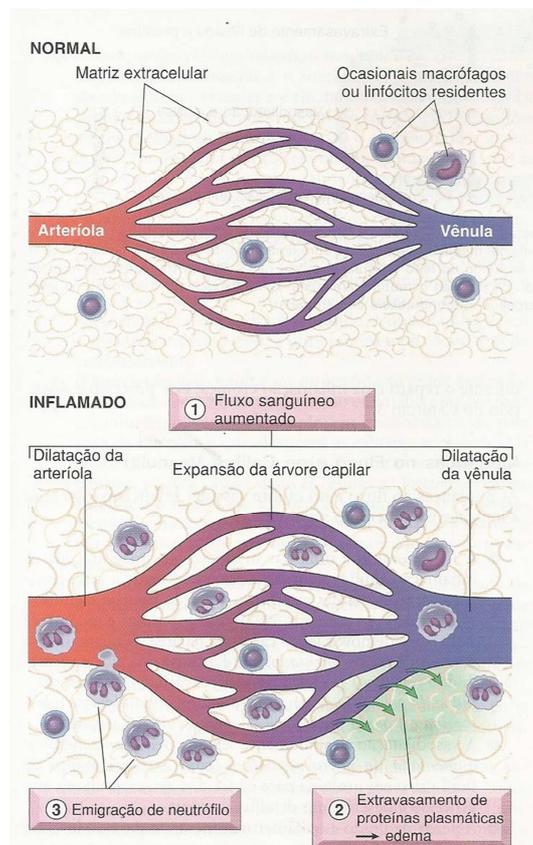
A habilidade dos organismos de se livrarem de tecidos danificados ou necróticos e invasores estranhos como micro-organismos é essencial para sua sobrevivência. A resposta dos hospedeiros que executa esses objetivos é chamada de inflamação. O processo inflamatório consiste em uma sequência complexa de eventos que ocorrem em tecidos vascularizados em resposta a diferentes estímulos, podendo estes serem de natureza tanto endógena como exógena, de natureza química, física ou biológica. Esta é uma resposta fundamentalmente protetora, destinada a livrar os organismos tanto da causa inicial da injúria celular quanto das consequências dessa injúria. Sem a inflamação, as infecções poderiam passar despercebidas, ferimentos poderiam nunca cicatrizar e os tecidos injuriados poderiam ficar com permanentes feridas infeccionadas. No entanto, se esse processo ocorre de forma exacerbada ou inoportuna, pode ser prejudicial, sendo muitas vezes necessário o uso de substâncias que modulem esses eventos, como os anti-inflamatórios, que permita sua ocorrência mais tenue sem suas sequelas nocivas. (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985; ROBBINS *et al.*, 2010).

Embora as características clínicas da inflamação tenham sido descritas desde aproximadamente 3.000 a.C., Celsius, um escritor egípcio do primeiro século d.C., foi quem primeiro listou os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor (vermelhidão), tumor (inchaço), calor (aquecimento) e dolor (dor) (WEISSMAN, 1992). Um quinto sinal clínico, a perda de função (*functio laesa*) foi adicionado por Rudolf Virchow no século XIX. Esses sinais são tipicamente mais proeminentes na inflamação aguda do que na inflamação crônica. Em 1793, o cirurgião escocês John Hunter notou que a inflamação não é uma doença, mas uma resposta inespecífica que tem um efeito salutar no hospedeiro, fato que atualmente parece ser óbvio (HUNTER, 1794).

A inflamação pode ser aguda ou crônica, dependendo da natureza do estímulo, das características patológicas da reação inflamatória e da efetividade da reação inicial em eliminar o estímulo ou os tecidos danificados. A inflamação aguda é rápida no início, que geralmente dura minutos, e de curta duração persistindo por horas ou poucos dias. Suas principais características (FIGURA 23) são a exsudação de fluido rico em proteínas do plasma, com conseqüente formação do edema, a migração de leucócitos, predominantemente

neutrófilos, para o sítio agredido e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação. Além disso, a inflamação aguda evoca uma série de reações sistêmicas, tais como: febre, elevação plasmática do nível de proteínas da fase aguda (α_2 –macroglobulina, inibidor da C1-esterase, fibrogênio, hepatoglobulina, componentes C3 e C5 do complemento e proteína C reativa), além de alteração de íons e metais (ROBBINS *et al*, 2010; BAUHMANN; GAULDIE, 1994).

Figura 23: Principais manifestações locais da inflamação aguda.



Fonte: Adaptado de ROBBINS *et al.*, 2010.1) Dilatação vascular e aumento no fluxo sanguíneo (causando eritema e calor); 2) extravasamento e deposição extravascular de fluido plasmático e proteínas (edema); 3) emigração e acúmulo de leucócitos no local da injúria.

Quando a inflamação aguda é bem sucedida na eliminação dos agentes agressores, a reação reduz-se, mas se a resposta falha na retirada dos agentes invasores, esta pode progredir para a fase crônica. A inflamação crônica pode se seguir à inflamação aguda ou ser insidiosa no início. Ela é de longa duração, podendo ir de semanas a meses, e está associada à presença dos linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual, onde destruição tecidual e tentativas de reparação ocorrem simultaneamente, muitas

vezes de forma assintomática (ROBBINS *et al.*, 2010; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

As reações vasculares e celulares da inflamação são disparadas por fatores solúveis que são produzidos por várias células ou derivadas de proteínas do plasma e são geradas ou ativadas em resposta aos estímulos inflamatórios. Micro-organismos, células necróticas e mesmo a hipóxia podem disparar a produção de mediadores inflamatórios e então provocar a inflamação. Tais mediadores iniciam e amplificam a resposta inflamatória e determinam seu padrão, severidade e manifestações clínicas e patológicas.

5.2 Eventos vasculares da inflamação aguda

Na inflamação, os vasos sanguíneos passam por uma série de mudanças que são destinadas a maximizar o movimento de proteínas plasmáticas e células circulantes para fora da circulação e para dentro do local da infecção ou injúria (LENTSCH; WARD, 2000; ROBBINS *et al.*, 2010). A inflamação aguda tem três principais componentes: 1) alterações no calibre vascular que levam a um aumento do fluxo sanguíneo; 2) mudanças estruturais na microvasculatura que permitem que as proteínas do plasma e os leucócitos saiam da circulação e 3) emigração de leucócitos da microcirculação, seu acúmulo no foco da injúria e sua ativação para eliminar o agente agressor (ROBBINS *et al.*, 2010).

A vasodilatação é uma das manifestações mais iniciais da inflamação aguda, sendo algumas vezes seguida de constrição transitória das arteríolas, como uma resposta motora na tentativa de recuperar a homeostase, decorrente da liberação de catecolaminas e de prostaglandinas por células lesadas, que dura poucos segundos. Em seguida ocorre a vasodilatação, que envolve as arteríolas e então leva a abertura de novos leitos capilares na área. O resultado é o fluxo sanguíneo aumentado, que é a causa do calor e vermelhidão no local da inflamação. Essa reação é induzida pela ação de vários mediadores, notavelmente a histamina, o óxido nítrico (NO), a bradicinina, a serotonina e as prostaglandinas das séries E e I no músculo liso vascular (BHANDARI *et al.*, 2005; ROBBINS *et al.*, 2010).

Seguido a vasodilatação ocorre o aumento da permeabilidade da microvasculatura, com o extravasamento de fluido rico em proteínas para os tecidos extravasculares. O principal papel da mudança na permeabilidade vascular é facilitar a chegada de células e fatores solúveis, como anticorpos e proteínas da fase aguda, ao sítio da lesão tecidual. Vários mecanismos são responsáveis por essa resposta, sendo os principais a contração das células do endotélio, resultando em espaços vasculares aumentados. Este é o

mecanismo mais comum de extravasamento vascular e é elicitado por histamina, bradicinina, leucotrienos, neuropeptídeo substância P e muitos outros mediadores químicos (LAMPUGNANI; DEJANA, 1997; MEHTA; MALIK, 2006). Outro mecanismo é a injúria endotelial, resultando em necrose da célula endotelial, que pode ser causada por um dano direto ao endotélio, por exemplo, em queimaduras ou pela ação de micróbios que alcançam as células endoteliais (LENTSCH; WARD, 2000; VALBUENA; WALKER, 2006). Um terceiro mecanismo é a transcitose, que é o transporte aumentado de fluidos e proteínas pela célula endotelial. Esse processo pode envolver canais consistindo em vesículas e vacúolos não revestidos interconectados, chamados de organelas vesículo-vacuolares, muitos dos quais localizados próximo às junções intercelulares (DVORAK; FENG, 2001).

Estudos propõem que a histamina e leucotrienos causem contração endotelial, que a IL-1 e TNF- α participam da reorganização citoesquelética endotelial e que leucócitos e agentes agressores causam lesão vascular direta e extravasamento de fluidos. Além disso, o exsudato contém vários mediadores que influenciam as células adjacentes e os próprios vasos sanguíneos incluem ativação de quatro cascatas enzimáticas: do complemento, da coagulação, das cininas e fibrinolítica (ROBBINS *et al.*, 2010).

Devido ao aumento do diâmetro do vaso sanguíneo e da perda de fluido ocorre um aumento na viscosidade do sangue e conseqüentemente uma lentificação do fluxo sanguíneo, resultando em hemoconcentração, condição denominada de estase. À medida que esse fenômeno ocorre, os leucócitos, principalmente os neutrófilos, no intuito de serem recrutados para os locais de injúria ou infecção, aproximam-se e interagem com o endotélio dando início ao processo chamado de rolamento e posteriormente adesão ao endotélio (ROBBINS *et al.*, 2010; WAGNER; ROTH, 2000). Essas etapas são descritas como eventos celulares da inflamação que serão detalhados a seguir.

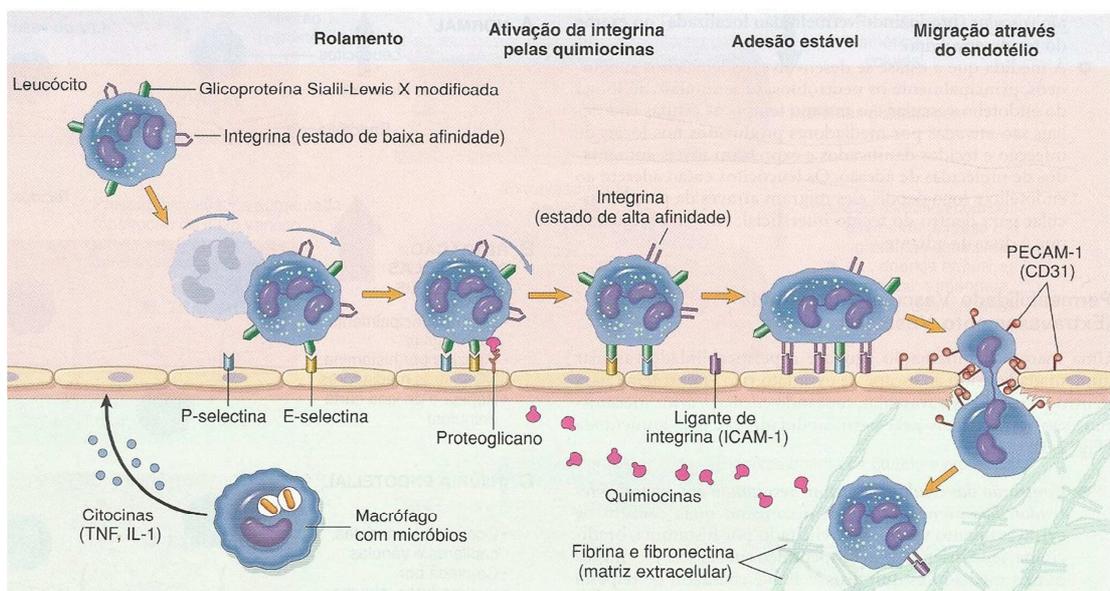
5.3 Eventos celulares da inflamação aguda

Um dos principais eventos do processo inflamatório é a migração de leucócitos, principalmente dos neutrófilos, para o local da injúria e a ativação dos mesmos para eliminar os agentes agressores. Nas reações inflamatórias os principais leucócitos são os neutrófilos e os macrófagos, que são aqueles capazes de fagocitar, ou seja, ingerir e destruir bactérias e outros micróbios eliminando o tecido necrótico e substâncias estranhas, além de serem também capazes de produzirem fatores de crescimento que ajudam no processo de reparo. É

visto que o próprio infiltrado contribui para a amplificação da resposta inflamatória, através da liberação de mediadores vasoativos e quimiotáticos. Os neutrófilos são os leucócitos predominantes no infiltrado nas primeiras 24 horas, sendo mais tarde substituído por células mononucleares. (McEVER, 1991; ROBBINS *et al.*, 2010).

Três principais eventos consistem nos processos envolvendo os neutrófilos na inflamação, são eles: o recrutamento de neutrófilos do sangue para dentro dos tecidos extravasculares, o reconhecimento por eles dos micróbios e tecidos necróticos e a remoção do agente agressor. A migração dos neutrófilos é um processo complexo e envolve uma série de interações com o endotélio vascular e com a matriz extracelular, que culminam com a passagem da célula para o espaço extravascular. Devido ao fluxo sanguíneo se lentificar no princípio da inflamação (estase), as condições hemodinâmicas mudam e mais neutrófilos assumem uma posição periférica ao longo da superfície endotelial, processo chamado de marginação. Posteriormente ocorre o processo de rolamento, mostrado na figura 24, quando estes aderem transitoriamente ao endotélio, ligando-se e desligando-se novamente, rolando assim na parede do vaso. E por fim, a transmigração, que é a passagem do neutrófilo pelas células endoteliais e, finalmente, o direcionamento até o foco da lesão sob influência dos estímulos quimiotáticos (WAGNER, ROTH, 2000; ROBBINS *et al.*, 2010).

Figura 24 – Etapas da migração de neutrófilos ao longo dos vasos sanguíneos.



Fonte: Adaptado de ROBBINS *et al.*, 2010.

O processo de rolamento possui como pré-requisito a ativação da monocamada de células endoteliais por sinais teciduais, que induzem a expressão de moléculas de adesão, tanto nos leucócitos quanto nas células endoteliais, e a secreção de mediadores inflamatórios pelo endotélio. As interações iniciais de rolamento são mediadas por uma família de proteínas chamadas selectinas. Existem três tipos de selectinas: as L-selectinas, expressas na superfície dos leucócitos, são responsáveis pelo endereçamento (*homing*) durante a ligação com o endotélio. As E-selectinas, expressas no endotélio após a liberação de citocinas inflamatórias, se ligam a resíduos siálicos de oligossacarídeos da superfície dos leucócitos, de maneira dependente de cálcio. Por fim as P-selectinas, armazenadas em α -grânulos de plaquetas e corpos de Weibel-Palade das células endoteliais, são expressas por citocinas, trombina, histamina, dentre outros mediadores, e assim como as E-selectinas, também se ligam a resíduos siálicos. A expressão das selectinas e seus ligantes é regulada pelas citocinas produzidas em resposta à infecção e injúria. Os macrófagos teciduais, mastócitos e células endoteliais ao interagirem com micróbios ou tecidos mortos respondem secretando várias citocinas, incluindo TNF, IL-1 e quimiocinas (DINARELLO, 2005; JOHNSTON; BUTCHER, 2002; SALLUSTO; MACKAY, 2004; ROBBINS *et al.*, 2010).

O processo de adesão é mediado por uma família de proteínas heterodiméricas de superfície dos leucócitos chamadas de integrinas. O início da adesão ocorre devido à redução da velocidade dos leucócitos que permite uma ligação mais firme ao endotélio. O fator de necrose tumoral e a interleucina-1 induzem a expressão endotelial de ligantes para as integrinas, principalmente a VCAM-1 (molécula-1 de adesão da célula vascular), ligante para a integrina VLA-4, e a ICMA-1 (molécula-1 de adesão intercelular), ligante para as integrinas LFA-1 e Mac-1. Outros ligantes para integrinas de grande importância para a inflamação são a ICAM-2 (molécula-2 de adesão intracelular) e a PCAM-1 (molécula de adesão entre célula endotelial e plaqueta) (PANÉS *et al.*, 1999; CRONSTEIN; WEISSMAN, 1993).

Normalmente, os leucócitos expressam integrinas em um estado de baixa afinidade. Enquanto isso, as quimiocinas que foram produzidas no local da injúria entram no vaso sanguíneo, ligam-se aos proteoglicanos das células endoteliais e são mostradas em alta concentração na superfície endotelial. Essas quimiocinas se ligam e ativam os leucócitos em rolamento. Uma das consequências da ativação é a conversão das integrinas VLA-4 em LFA-1 nos leucócitos em um estado de alta afinidade (COOKMILLS; DEEM, 2005). A combinação da expressão de ligantes de integrinas induzida pelas citocinas do endotélio e a ativação das integrinas nos leucócitos resulta em firme ligação mediada pelas integrinas dos leucócitos ao endotélio no local da inflamação. Os leucócitos param de rolar, seus

citoesqueletos são reorganizados e eles se espalham para fora da superfície endotelial, dando início ao processo de migração dos leucócitos através do endotélio (ROBBINS *et al.*, 2010).

A transmigração, ou migração dos leucócitos através do endotélio, ocorre principalmente nas vênulas pós-capilares. As quimiocinas agem nos leucócitos aderentes e estimulam as células a migrarem através dos espaços interendoteliais em direção ao gradiente de concentração químico, que é em direção ao local da injúria ou infecção onde as quimiocinas estão sendo produzidas (PETRI; BIXEL; 2006).

5.4 Dor e Nocicepção

A dor se classifica como um fenômeno que compreende uma diversidade de experiências diferentes e únicas, tendo causas diversas variando com alguns critérios como somatosensoriais, viscerais, afetivos, culturais e cognitivos. A dor é uma característica cardinal dos mecanismos protetores fisiológicos normais e uma de suas funções é preservar o organismo do dano tecidual. O sistema nervoso informa sobre a ocorrência ou perigo de injúria e a sensação de dor contribui para esta função, estando, dessa forma relacionado às reações de fuga e esquiva (BESSON; DICKENSON, 1997; RIEDEL; NEECK, 2001).

De acordo com a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) a dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termo de tal lesão”. Dessa forma, a dor é altamente subjetiva e influenciada por fatores comportamentais, fisiológicos, sensoriais e emocionais o que corresponde a uma grande variação individual na resposta à sensação de dor (JULIUS; BASBAUM, 2001; IASP, 2012). A dor é um sintoma de muitos distúrbios clínicos e afeta grande parte da população. Estudos mostram que a dor afeta os mais variados domínios da qualidade de vida humana, sendo estes físicos ou emocionais. A intensidade, a extensão, a duração, o significado, entre outras características são individuais e estão relacionadas com o que provoca a dor, caracterizando dessa forma uma sensação íntima e pessoal, sendo impossível uma mensuração exata (BESSON; DICKENSON, 1997; NIV; KREITLER, 2001).

Existe uma diferença entre os termos nocicepção e dor. O termo nocicepção refere-se a manifestações neurofisiológicas geradas por estímulos nocivos, já o termo dor refere-se à percepção de um estímulo aversivo e requer a capacidade de abstração e elaboração do impulso sensorial. Dessa forma, além de envolver um estímulo potencialmente nocivo, a dor tem uma conotação individual e é representada por uma experiência subjetiva,

incluindo componentes afetivos e emocionais, que amplificam ou diminuem a sensação dolorosa (MELZACK; LOESER, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004).

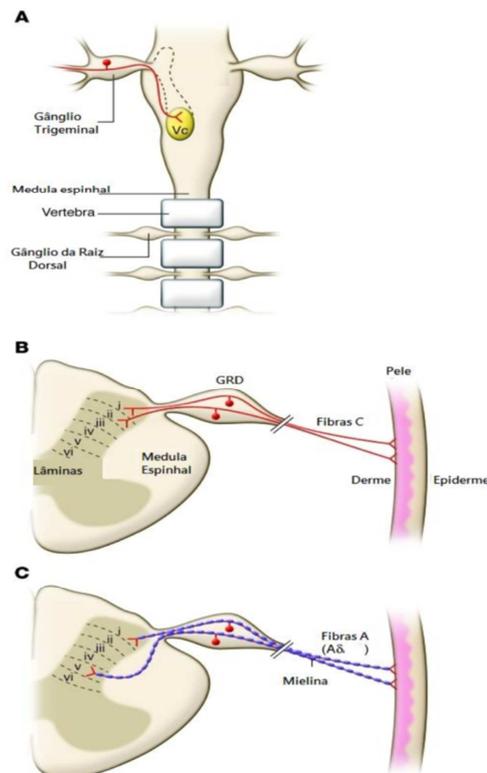
5.5 Mecanismo de transmissão da dor

O processo de propagação da dor é iniciado pela ativação de receptores, chamados de nociceptores, encontrados na pele, membranas, tecidos conjuntivos de órgãos viscerais, ligamentos, cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões e vasos sanguíneos, que são sensíveis aos estímulos nocivos. Os nociceptores correspondem às terminações nervosas livres e representam a parte mais distal dos neurônios aferentes de primeira ordem, que consistem em fibras de pequeno diâmetro com pouca ou nenhuma mielina, dos tipos A δ e do tipo C, respectivamente (LYNN, 1992; MENSE, 1983; ALMEIDA *et al.*, 2004).

As fibras A δ são pouco mielinizadas, de médio diâmetro e medeiam a “primeira” dor, representada pela dor pungente, aguda e passageira, que aparece logo após a lesão tecidual. Por apresentarem a bainha de mielina, transmitem o estímulo doloroso de forma rápida (2 a 30 m.s⁻¹) e correspondem a 20% das fibras que conduzem a informação nociceptiva e são responsáveis pela dor de curta duração. As fibras C não são mielinizadas, e são responsáveis pela condução lenta da dor (0,5 a 2 m.s⁻¹) e possuem pequeno diâmetro, mediando a “segunda” dor, mais latente e difusa e de maior duração. Cerca de 80% das fibras aferentes sensoriais são do tipo C (GRUBB, 1998; ROCHA *et al.*, 2007; CRAIG, 2003). As fibras A δ e C podem ser chamadas de polimodais, pois respondem a estímulos nocivos sejam eles térmicos, mecânicos e químicos, apresentando receptores termosensíveis ao calor e ao frio, bem como receptores específicos para substâncias algôgenicas (RAJA *et al.*, 1999; HUNT; MANTYH, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2004).

A informação nociceptiva é levada através das fibras aferentes ao SNC pela estimulação dos nociceptores periféricos. Os longos axônios das fibras nociceptivas que se localizam em nervos periféricos estendem-se de seus corpos celulares contidos em uma estrutura denominada gânglio da raiz dorsal. Após emergir de seu corpo celular, o axônio aferente primário bifurca-se para enviar prolongamentos à medula espinhal e outro para inervar os tecidos corporais (MILLAN, 1999). Na medula espinhal o corno dorsal é dividido em lâminas de acordo com as características citológicas dos neurônios e da divisão anatômica, como visto na figura 25 (BASBAUM; JESSELL, 2003).

Figura 25 – Anatomia de nociceptores.

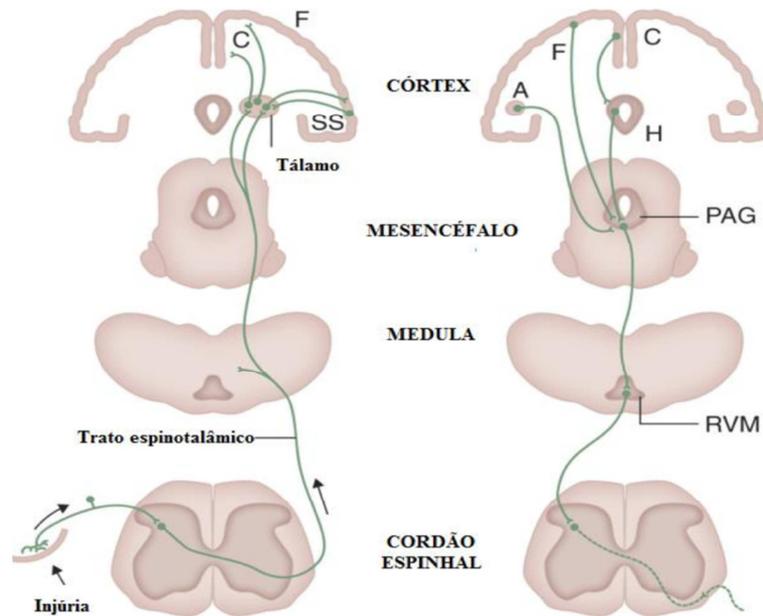


Fonte: Adaptado de GOODMAN; GILMAN'S, 2007. A) Neurônios somatosensoriais estão localizados em gânglios periféricos (trigeminal e GRD), ao longo do lado da coluna vertebral e medula. Neurônios aferentes projetam-se centralmente para o tronco cerebral (Vc) e corno dorsal da medula espinal e periféricamente para a pele e outros órgãos. (B) A maioria dos nociceptores são amielínicos com axônios de pequenos diâmetro (fibras C, em vermelho). Inervam aferentes periféricos da pele (derme e/ou epiderme) e projetam-se centralmente para as lâminas I e II do corno dorsal. (C) As fibras nociceptivas AX são mielinizadas e têm geralmente maior velocidade de condução. Estas se projetam para as lâminas I e V.

Na medula, a transmissão dos sinais dolorosos após a liberação dos neurotransmissores envolve a participação de canais iônicos que quando modulados geram correntes que despolarizam ou hiperpolarizam a membrana celular dos neurônios causando excitação ou inibição neuronal, assim facilitando ou dificultando a passagem do impulso para as vias ascendentes medulares (ALTIER; ZAMPONI, 2004). A participação de canais iônicos, principalmente sódio e cálcio, operados por voltagem, e os canais de potássio, está intimamente ligada à transmissão dos sinais dolorosos. A liberação de neurotransmissores (glutamato, substância P (SP), prostaglandinas (PG) e trifosfato de adenosina - ATP) na medula, geram correntes que despolarizam ou hiperpolarizam a membrana celular dos neurônios através da modulação desses canais, provocando excitação ou inibição neuronal, o

que facilita ou dificulta a passagem do impulso para as vias ascendentes medulares (ALTIER; ZAMPONI, 2004; LEE *et al.*, 2005; DOUBELL *et al.*, 1999).

Figura 26 – Transmissão e vias de modulação da dor.



Fonte: Adaptado de GOODMAN; GILMAN'S, 2007. À esquerda um estímulo nocivo aplicado à pele induz impulsos com ativação de nociceptores periféricos, se propagando para o corno dorsal da medula espinal, onde são ativadas as células nervosas de origem do trato espinotalâmico. O trato espinotalâmico ativa os neurônios do tálamo, que se projetam e ativam neurônios no córtex cingulado (C), córtex frontal (F), e córtex somatossensorial (SS). À direita, uma variedade de estímulos pode ativar circuitos de modulação da dor. Projeções do córtex frontal e cingulado e aferentes da amígdala (A) e hipotálamo (H) convergem para o mesencéfalo, neurônios da substância cinzenta periaquedural (PAG), que, através da medula ventromedial rostral (RVM), controla a transmissão da dor pelos neurônios espinotalâmicos.

O sistema nervoso central modula a transmissão da informação sensorial onde interconexões entre vias na medula espinal podem controlar a transmissão da informação nociceptiva para os centros supraespinhais. A inibição descendente faz parte de um mecanismo de regulação responsável por diminuir a transmissão da resposta dolorosa diminuindo a intensidade da transmissão (BASBAUM; JESSEL, 2003).

5.6 Dor de origem inflamatória

Diversos mediadores químicos são liberados por células não neuronais e neuronais no local da injúria (substâncias algôgenicas) e surgem em decorrência de processos

inflamatórios traumáticos ou isquêmicos. Estes mediadores não neuronais são comumente histaminas, serotoninas, bradicininas, citocinas, eicosanoides dentre outros, já os mediadores neuronais são principalmente a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGPR). Dependendo da natureza e concentração do mediador ele pode ativar diretamente o nociceptor e/ou reduzir seu limiar de ativação (DAVIS *et al.*, 1989; HANDWERKER *et al.*, 1989; McMAHON; FERREIRA 1993).

A liberação de mediadores em tecidos inflamados pode sensibilizar fibras nociceptivas periféricas, promovendo a facilitação central da transmissão nociceptiva, levando a uma resposta dolorosa aumentada a um estímulo nocivo, chamada hiperalgesia (SYRIATOWICZ *et al.*, 1999; COUTAUX *et al.*, 2005). Além disso, alterações na percepção sensorial, envolvendo sensibilização central, pode levar a alodínia, que é uma dor evocada por um estímulo normalmente não nocivo (MILLAN, 1999).

Dessa forma, as células residentes (principalmente macrófagos e mastócitos) parecem ter papel primordial neste processo, pois estas células sinalizam a presença de injúria ou material estranho, através da liberação de variados mediadores inflamatórios, que além de atuar no nociceptor, recrutam células inflamatórias (polimorfonucleares, linfócitos) que produzem um efeito amplificador na inflamação e nocicepção (FERREIRA, 1993).

Embora o número de lectinas animais purificadas e caracterizadas venha aumentando e cada vez mais o estudo dessas macromoléculas mostra-se de grande importância para a biotecnologia, poucas atividades biológicas são descritas referentes a essas proteínas. A primeira lectina animal a apresentar atividade anti-inflamatória foi a HGA, purificada do equinodermo *Holothuria grisea* por Moura e colaboradores em 2010. A lectina HGA demonstrou ser capaz de modular a resposta inflamatória em modelos de inflamação *in vivo* (MOURA, 2010).

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos (*Mus musculus*) com peso aproximado entre 20 e 30 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e foram mantidos em caixas plásticas, contendo maravalha, sob condições adequadas de luz e temperatura e recebendo água e ração *ad libitum*

até a realização dos procedimentos experimentais. Todos os animais foram tratados seguindo as recomendações preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e os experimentos relacionados à dor seguiram as diretrizes prescritas pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (ZIMMERMANN, 1983). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Inflamação (LAFFIN) da Universidade Estadual do Ceará, em colaboração com a professora Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy, e todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UECE nº 10130208/40). A eutanásia dos animais foi realizada por deslocamento cervical.

6.2 Atividades de nocicepção e inflamação induzidas por ácido acético (0,8% v/v)

Este teste foi realizado para avaliar a atividade antinociceptiva da lectina isolada do muco de *A. fulica*, sendo este um modelo de nocicepção química que investiga a dor inflamatória, avaliando tanto a atividade analgésica como anti-inflamatória (VINEGAR *et al.*, 1987; TJOLSEN; HOLE, 1997). Para isso, os camundongos foram tratados 30 minutos antes da injeção de ácido acético com a lectina AFL em doses de 0,1; 1 e 10 mg.kg⁻¹, indometacina (10 mg.kg⁻¹) como controle positivo, ou salina (NaCl 0,9%) como controle negativo, por via intravenosa (i.v.). Após 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam também por via intraperitoneal (i.p.) solução de ácido acético (0,8% v/v) e o número de contorções abdominais foram contadas durante 20 minutos após 10 minutos da injeção (KOSTER *et al.*, 1959). Os resultados foram expressos como o número de contorções por minutos ± E.P.M. (Erro padrão da média).

No intuito de investigar o efeito da AFL no processo inflamatório, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal exposta, através de uma incisão longitudinal, e lavada injetando-se 2 mL de PBS heparinizado (10 UI.mL⁻¹). Após massagem do peritônio o fluido foi coletado para quantificação da Mieloperoxidase (MPO), um marcador indireto de infiltrado neutrofílico. As amostras de fluido em volume de 100 µL foram homogeneizadas em tampão de fosfato de potássio 50 mM pH 6,0 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio, para volume final de 1 mL, e posteriormente centrifugados por 2 minutos a 8.000 g a 4 °C. As alíquotas dos sobrenadantes foram incubadas com solução de cloridrato de *o*-dianisidina a 0,167 mg.kg⁻¹ contendo 0,005% de H₂O₂ em placas de 96 poços. A atividade de MPO foi medida cineticamente em scanner de placa de

microlitro à 450 nm nos tempos 0 e 1 minuto, e os resultados foram expressos como unidades de MPO por mL (BRADLEY *et al.*, 1982).

6.3 Teste de nociceção e inflamação induzidos por Formalina

O teste da formalina é um típico modelo de avaliação de nociceção, e para a realização deste teste os animais foram inicialmente colocados individualmente sob funis de vidro invertido com espelho ao fundo, que auxilia na observação do comportamento animal, por um período de adaptação de no mínimo 20 minutos. Para avaliar a atividade antinociceptiva da AFL, utilizou-se a dose de melhor efeito no teste das contorções abdominais ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) por via intravenosa. Os animais foram pré-tratados com a lectina ou indometacina (10 mg.kg^{-1}), 30 minutos antes do teste. Passado os 30 minutos do pré-tratamento, cada animal recebeu uma injeção intraplantar (i.pl.) de $20 \mu\text{L}$ de formalina (2,5% v/v) na pata posterior direita e o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi mensurado.

Este teste possui duas fases a serem analisadas, a primeira fase do teste (Fase I), ocorre durante os primeiros 5 minutos após a injeção de formalina e é caracterizada pela estimulação direta desta sobre o nociceptor dando origem a dor neurogênica. Já a segunda fase (Fase II) ocorre 15 a 30 minutos após a injeção da formalina e representa a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória, conhecida como dor inflamatória (HUNSKAAR *et al.*, 1985). Esses testes foram realizados à temperatura ambiente para excluir fatores experimentais que possam afetar o fluxo sanguíneo periférico devido à grande sensibilidade da resposta na fase tardia (LE BARS *et al.*, 2001). Os resultados foram expressos como o tempo de lambidas por segundos \pm E.P.M.

Este mesmo teste foi utilizado para verificar se a atividade biológica da lectina é referente ao sítio de ligação a carboidrato. Para isso, a participação do domínio lectínico foi avaliada através administração da AFL ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) associada ao açúcar ligante α -lactose (0.1 M) após prévia incubação por 60 min à $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Os grupos controles receberam a lectina ou o açúcar isoladamente, sob as mesmas condições de incubação.

Para analisar o efeito da AFL no processo inflamatório, o edema de pata foi medido por hidropletismometria (Panlab – LE – 7500) antes (tempo zero) e após 30 minutos da injeção de $20 \mu\text{L}$ de formalina (2,5%). Em seguida, foi administrado por via intravenosa a AFL na concentração de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ou salina, 30 minutos antes da indução da inflamação.

As aferições foram realizadas também nos tempo de 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a administração do estímulo inflamatório. O resultado foi expresso como a variação dos volumes das patas (mL) \pm E.P.M.

6.4 Modelo de nociceção induzida por elevação de temperatura: Teste da Placa Quente

Para este teste, inicialmente os camundongos foram pré-tratados com AFL (0,1 mg.kg⁻¹) via intravenosa ou com morfina (5 mg.kg⁻¹) via subcutânea como controle positivo, 30 minutos antes da exposição ao estímulo. Posteriormente os animais foram colocados sobre uma placa aquecida à (55 \pm 0,5 °C) e após 30 minutos o tempo de resposta foi avaliado nos intervalos de 30, 60, 90, 120 e 150 minutos após o início do teste. Nestes intervalos foi observado o tempo de latência ao estímulo térmico, ou seja, quanto tempo os animais levaram para manifestar uma resposta, que corresponde ao ato de saltar e/ou lambe ou morder a pata traseira, sendo este método utilizado com a finalidade de pesquisar substâncias que atuam a nível de Sistema Nervoso Central (EDDY; LEIMBACH, 1953). Os resultados foram expressos como o tempo de reação em segundos \pm E.P.M.

6.5 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M. com número de animais por experimento variando entre 6 e 8 (n= 6 - 8) e para análise estatística foi utilizado o Software GraphPad Prisma e as diferenças estatísticas significativas foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) seguido de teste corretivo de Bonferroni. Para todos os testes foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

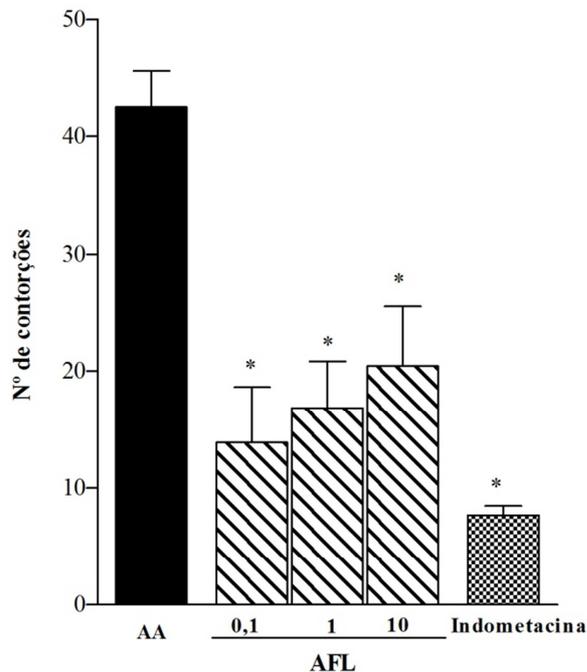
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 AFL inibe a nociceção induzida por ácido acético e formalina mas não por estímulo térmico

A injeção por via intraperitoneal (i.p.) do agente ácido acético, após um período de 20 min, induziu elevado número de contorções abdominais ($42,5 \pm 3,0$) nos camundongos. No entanto, quando os camundongos foram tratados previamente com AFL, observou-se uma redução significativa no comportamento nociceptivo nas doses de $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($13,8 \pm 4,7$), 1 mg.kg^{-1} ($16,8 \pm 3,9$) e 10 mg.kg^{-1} ($20,4 \pm 5,0$) em 68%, 60% e em 48%, respectivamente como mostra a figura 27. O controle de indometacina (10 mg.Kg^{-1}) reduziu as contorções 82% ($7,6 \pm 0,7$). Como não houve diferença estatística entre as doses, utilizou-se nos testes subsequentes a dose de $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$ da AFL.

Os resultados de atividade de inflamação e nocicepção foram comparados com os da lectina purificada de *Holothuria grisea*, a primeira lectina de invertebrado marinho a apresentar atividade anti-inflamatória. Esta lectina possui massa molecular aparente de 105,7 kDa e sua atividade não depende de ions metálicos. A HGA foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais em 27, 90 e 84% nas concentrações de 0,1, 1 e 10 mg.kg^{-1} .

Figura 27 – AFL inibe as contorções abdominais induzidas por ácido acético.



Fonte: Elaborado pela autora. Animais foram pré-tratados com solução salina (e.v.), indometacina (i.p.) ou AFL ($0,1$; 1 ou 10 mg.kg^{-1} ; e.v.), 30 min antes da injeção de ácido acético 0,8% (i.p.) (AA). Média \pm E.P.M. (n= 8). ANOVA e Bonferroni, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

O teste de contorção abdominal induzida por ácido acético é um modelo amplamente utilizado na triagem de compostos sintéticos e naturais, pois possui sensibilidade tanto aos AINE's quanto aos opióides, atuando neste modelo tanto componentes centrais quanto periféricos (ZAKARIA *et al.*, 2006). Ao injetar intraperitonealmente o ácido acético ocorre a liberação de mediadores inflamatórios que induzem a nocicepção neste modelo, como a bradicinina, serotonina, histamina, substância P, prostaglandinas, que estimulam os neurônios nociceptivos sensíveis, além da liberação de citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-8 pelos macrófagos e basófilos presentes na cavidade abdominal (RIBEIRO *et al.*, 2000; FISCHER *et al.*, 2008; VERRI *et al.*, 2006).

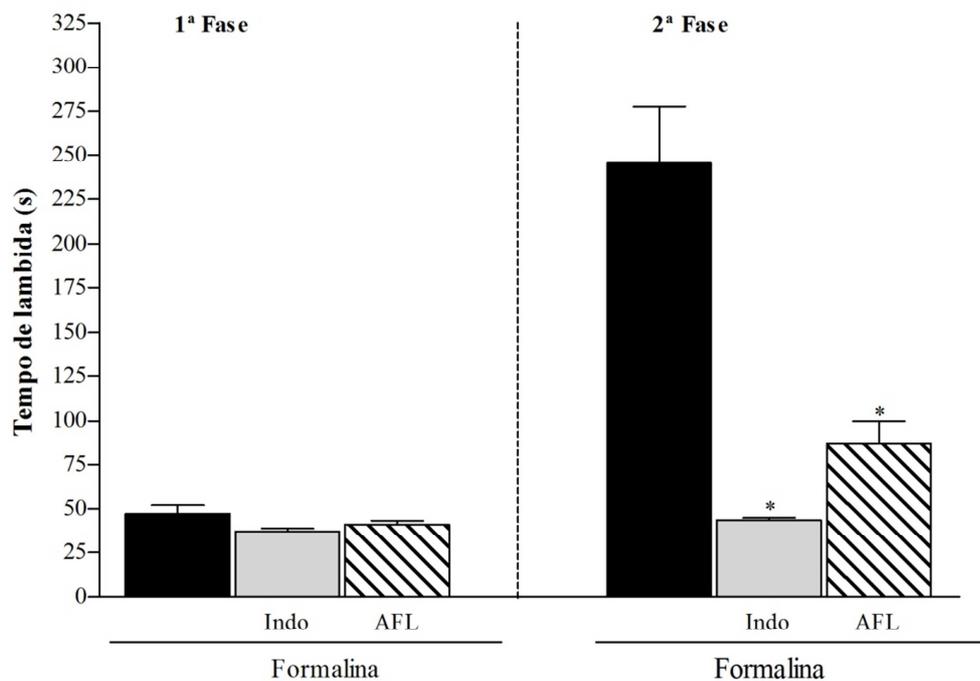
O fato da lectina ter sido capaz de reduzir o número de contorções abdominais mostra um efeito direto no processo de nocicepção. Este efeito provavelmente é derivado de um efeito anti-inflamatório. Para avaliar de forma mais precisa o efeito anti-inflamatório da lectina AFL assim como sua ação nociceptiva, foi realizado o teste da formalina, que se caracteriza por causar nocicepção pelo estímulo químico (McNAMARA *et al.*, 2007). Este teste é composto por duas fases, a primeira, chamada de Fase I, que compreende do tempo zero, ou seja, o tempo contado a partir da injeção do agente nociceptivo químico formalina, ao tempo de 5 minutos. Essa primeira fase é chamada de fase neurogênica e avalia a estimulação química direta nos nociceptores, agindo principalmente nas fibras do tipo C (HEAPY *et al.*, 1987; HUNSKAAR; HOLE, 1987). A informação é posteriormente conduzida pelos neurônios aferentes havendo a liberação de mediadores que produzem uma resposta local (TJOLSEN; HOLE, 1997). A segunda fase desse modelo, chamada de Fase II, ocorre nos tempos de 15 a 30 minutos do estímulo químico e é chamada de fase inflamatória. Após a liberação de mediadores inflamatórios como a histamina, bradicinina, prostaglandinas e óxido nítrico, ocorre o extravasamento plasmático, a vasodilatação, a estimulação de macrófagos e mastócitos, que por sua vez promovem a liberação de mais mediadores do processo inflamatório (SHIBATA *et al.*, 1989). Para avaliar este modelo é observado o comportamento de lambar ou morder a pata tanto na primeira fase quanto na segunda fase do teste.

A injeção do agente químico formalina produziu um tempo de lambida das patas pelos animais de $47,2 \pm 4,8$ s na primeira fase e de $245,2 \pm 32,3$ s na segunda fase do teste. Na fase I de avaliação, AFL ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) não apresentou efeito antinociceptivo, pois não houve diferença no tempo de lambida em relação ao controle na Fase I de dor neurogênica. Já na segunda fase (fase II) a lectina AFL ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) produziu uma redução significativa de 64% ($87,0 \pm 12,8$ s) no tempo de lambida, em relação ao controle de formalina ($245,2 \pm 32,3$ s). A indometacina, utilizada como anti-inflamatório padrão, produziu efeito antinociceptivo de

82% ($43,5 \pm 1,4$ s) apenas durante a segunda fase do teste como mostra a figura 28. O que mostra um efeito considerado da capacidade anti-inflamatória da lectina utilizada.

Assim como a AFL a lectina HGA apresentou atividade anti-inflamatória somente na segunda fase do teste de origem inflamatória. A HGA reduziu o tempo de lambida em 69% na concentração de 10 mg.kg^{-1} , não apresentando atividade anti-inflamatória nas outras concentrações. No caso da lectina AFL a concentração $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ mostrou atividade semelhante a uma concentração 100 vezes maior de HGA ao apresentar redução de 64% no tempo de lambida.

Figura 28. AFL inibe a nocicepção induzida por formalina.



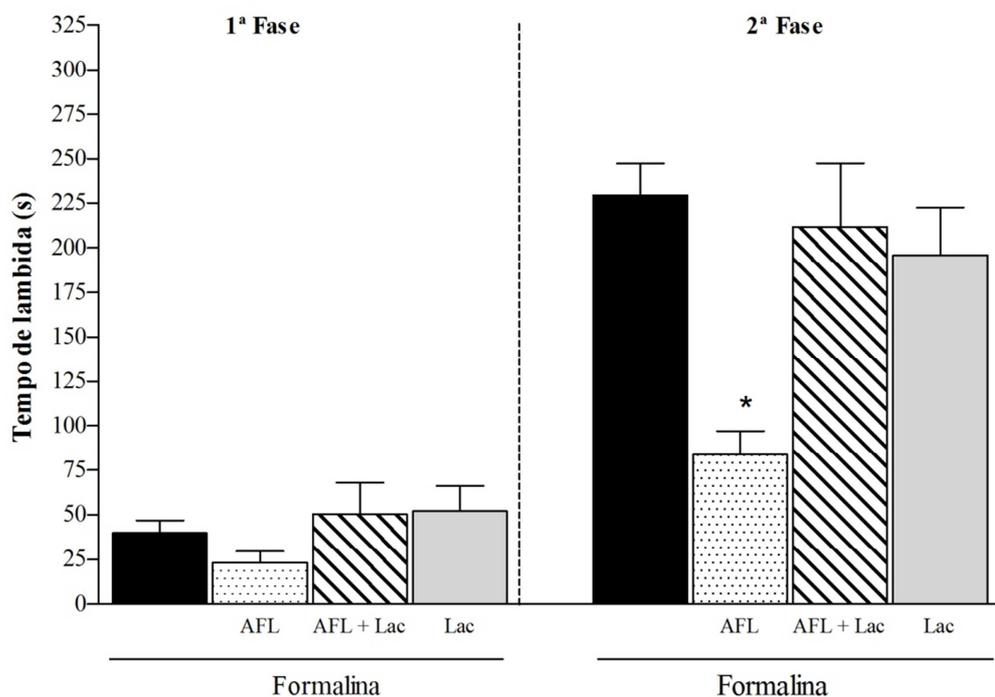
Fonte: Elaborado pela autora. Animais foram pré-tratados com solução salina (e.v.), indometacina (i.p.) ou AFL ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$; e.v.), 30 min antes da injeção de formalina 2,5% (i.pl.). Média \pm E.P.M. (n= 8). ANOVA e Bonferroni, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

É sabido que drogas analgésicas podem possuir ações diferentes na primeira e segunda fase do teste da formalina. No caso da lectina de AFL foi visto que ela não possui ação na dor neurogênica, já que não apresentou redução na atividade comportamental dos animais após o estímulo químico, ou seja, o tempo de lambida nas patas. Dessa forma, com

esse modelo podemos comprovar que a ação da lectina AFL está relacionada à dor inflamatória, podendo esta agir tanto nos mediadores inflamatórios, quanto nos processos que ocorrem durante a inflamação.

Na investigação da participação do domínio lectínico, foi observado que a lectina na concentração de $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ perde sua capacidade de inibir a nocicepção quando está associada ao açúcar inibidor lactose como mostra a figura 29.

Figura 29 – Reversão da atividade da lectina no teste da formalina quando incubada com lactose.

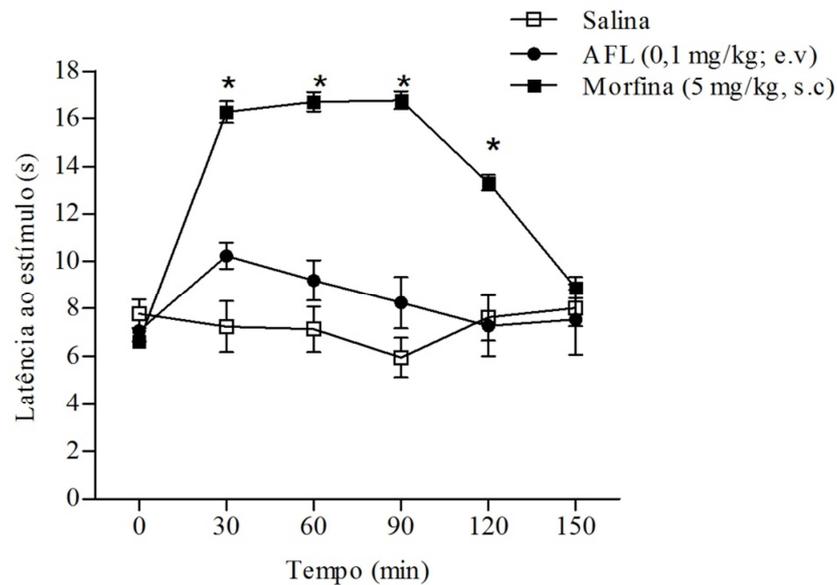


Fonte: Elaborado pela autora. Animais foram pré-tratados com solução salina (e.v.), AFL ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ e.v.) e AFL + LACTOSE $0,1M$ ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ e.v.), 30 min antes da injeção de formalina 2,5% (i.pl.). Média \pm E.P.M. (n= 8). ANOVA e Bonferroni, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Em relação ao teste da placa quente, a figura 30 mostra que o pré-tratamento com a AFL ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) não aumentou o tempo de latência dos animais em responder à este estímulo, nos tempos avaliados, quando comparado com o controle salina. Nos tempos posteriores não foi observado efeito significativo. Este resultado corrobora com a ausência de atividade da lectina AFL na fase I observada no teste de Formalina. Já o pré-tratamento com o

opióide morfina, apresentou efeito inibitório da nocicepção térmica em todos os tempos testados.

Figura 30. AFL não inibe a nocicepção térmica no teste da placa quente.



Fonte: Elaborado pela autora. Os animais foram colocados sobre a placa quente ($55 \pm 0,5$ °C) imediatamente antes e após (30, 60, 90, 120 e 150 min) a administração do AFL (0,1 mg/kg; e.v) ou morfina (5 mg/kg; s.c) e o tempo (em segundos) de latência ao estímulo registrado. Média \pm E.P.M. (n= 8). ANOVA e Bonferroni, * $p < 0,05$ em relação ao controle de salina.

O modelo de teste da placa quente é sensível a drogas que atuam no Sistema Nervoso Central, como analgésicos opióides, e é utilizado para avaliar o efeito de substâncias em nocicepção térmica. Este modelo é caracterizado por provocar uma resposta rápida mediada pela ação de nociceptores, como as fibras C e $A\delta$, ao estímulo nocivo como a alta temperatura (DICKENSON; BESSON, 1987).

Quando comparamos os efeitos de nocicepção da lectina AFL e da lectina HGA vimos que ambas, apesar de se mostrarem anti-inflamatórias, não apresentam efeito antinociceptivo em modelo de placa quente em nenhuma das doses testadas.

7.2 Atividade anti – inflamatória da AFL

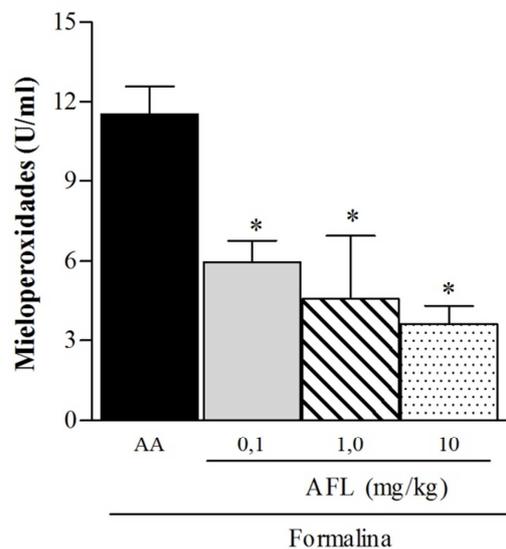
No estudo da lectinologia, vários trabalhos relacionados com a atividade da lectina no processo inflamatório mostram que essas proteínas podem atuar de forma a induzir ou inibir a inflamação pela capacidade de modular respostas celulares durante o processo,

atuando, por exemplo, na vasodilatação, na permeabilidade vascular, no recrutamento de leucócitos, na formação de edema, entre outros.

Para avaliar se a atividade da lectina AFL atua na migração de neutrófilos, foi quantificada a atividade da enzima Mieloperoxidase MPO, um marcador comum de infiltração neutrofílica nos tecidos, já que esta enzima é encontrada em seus grânulos azurofílicos (BRADLEY *et al.*, 1982).

Foi observado que a injeção intraperitoneal de ácido acético ($11,5 \pm 1,0 \text{ U.mL}^{-1}$) aumenta a atividade da Mieloperoxidase no fluido peritoneal dos animais. Corroborando com a inibição da dor de natureza inflamatória, a AFL reduziu de forma significativa a atividade de MPO nas doses de $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ em 48,6 % ($5,9 \pm 0,7 \text{ U.mL}^{-1}$), 1 mg.kg^{-1} em 60,5% ($4,5 \pm 2,3 \text{ U.mL}^{-1}$) e 10 mg.kg^{-1} com redução de 68,8% ($3,6 \pm 0,6 \text{ U.mL}^{-1}$) de acordo com a figura 31. A lectina HGA, usada como comparação de atividade biológica de lectina animal, também apresentou redução na migração de neutrófilos em 81,6% na concentração de 10 mg.kg^{-1} .

Figura 31 – AFL reduz os níveis MPO no fluido peritoneal em modelo de peritonite induzida por ácido acético.

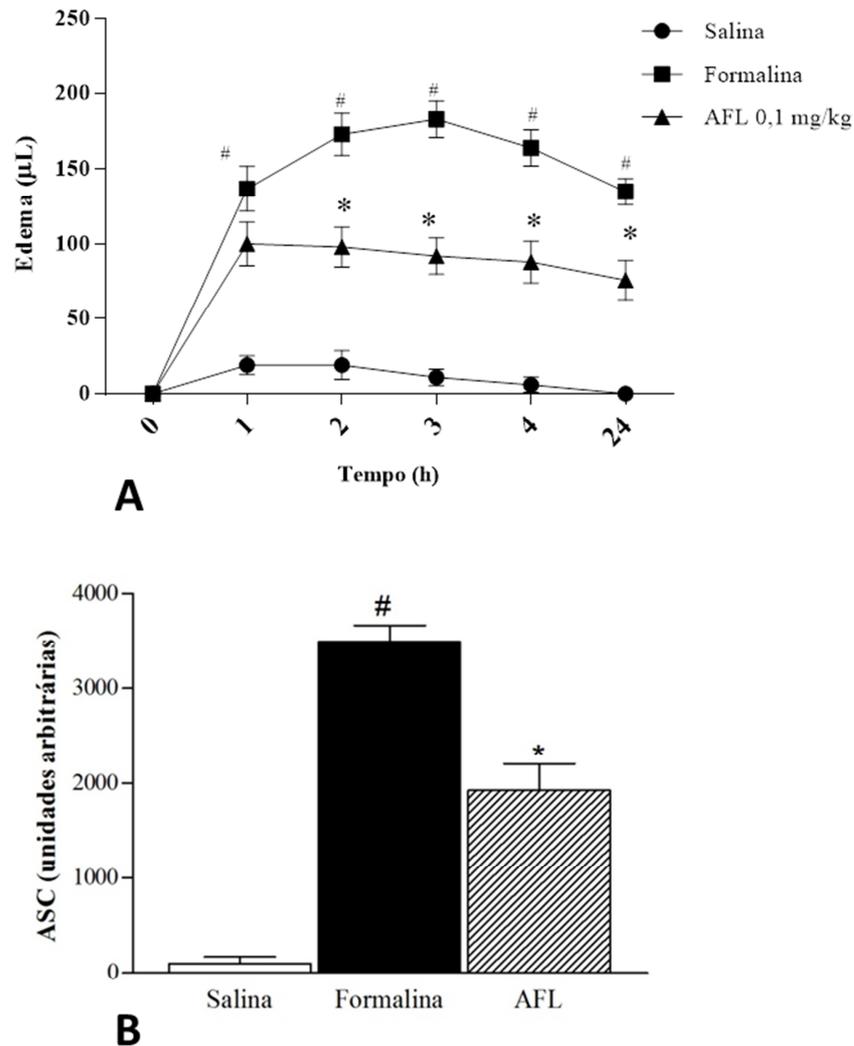


Fonte: Elaborado pela autora. Os animais receberam injeção (i.p.) de ácido acético para indução de peritonite. Animais foram pré-tratados com os AFL (0,1, 1 e 10 mg/kg), 30 min antes da indução do modelo e sacrificados na 1ª hora após o início da indução para análise dos níveis de MPO no fluido. Média ± E.P.M. (n= 8). ANOVA e Bonferroni, *p<0,05 em relação ao grupo ácido acético.

A injeção de formalina induziu edema de pata nos animais da 1-24ª hora de avaliação. O tratamento com AFL ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) por via endovenosa inibiu o edema induzido

por formalina a partir da 2ª hora em 43%, permanecendo na 3ª h em 49%, 4ª h em 46% até a 24ª hora como mostra a figura 32 A.

Figura 32. AFL inibe o edema de pata induzido por formalina.



Fonte: Elaborado pela autora. AFL (0,1 mg/kg; e.v.) foi administrada 30 min antes da formalina 2,5% (20 µl/pata, s.c.). O controle negativo recebeu salina 0,9% (s.c.). O edema foi medido no tempo (zero) e 1, 2, 3, 4 e 24 horas após o estímulo e expresso como a variação dos volumes das patas (mL). Média ± E.P.M. (n=6). ANOVA e teste de Bonferroni. * p<0,05 em relação a formalina; # p<0,05 em relação à salina. A: ação da AFL sobre o edema de pata induzido por formalina. B: Grafico de barra mostrando a redução do edema causado pelo pré-tratamento com a AFL.

Na avaliação global por meio de unidades arbitrárias (ASC), a injeção de formalina promoveu o aumento do volume da pata (ASC: 3497 ± 170) comparado à salina (AUC: $103,0 \pm 68,3$). O tratamento com AFL ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) reduziu o edema em 45% (AUC: $1924,0 \pm 280,7$) (Figura 32 B).

É crescente a busca por novas biomoléculas de interesse biotecnológico e os estudos de caracterização dessas macromoléculas é essencial para possibilitar a utilização nos diferentes campos da ciência. Os resultados obtidos com esses experimentos mostram o grande potencial da lectina do muco de *Achatina fulica* tanto em estudos de dor e inflamação como uma possível utilização desta lectina como uma droga com ações anti-inflamatórias e analgésicas. Por ter a capacidade de reconhecer carboidratos de interesse como o ácido sialico, esta lectina pode responder a diversas perguntas biológicas ainda não totalmente elucidadas, o que reforça a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a estrutura tridimensional desta lectina com e sem os açúcares de maior afinidade e com isso aumentar os dados para os estudos sobre o mecanismo de ação na inflamação e na dor.

**CAPÍTULO IV - ATIVIDADE CICATRIZANTE DA LECTINA
DO MUCO DE *Achatina fulica***

8. INTRODUÇÃO

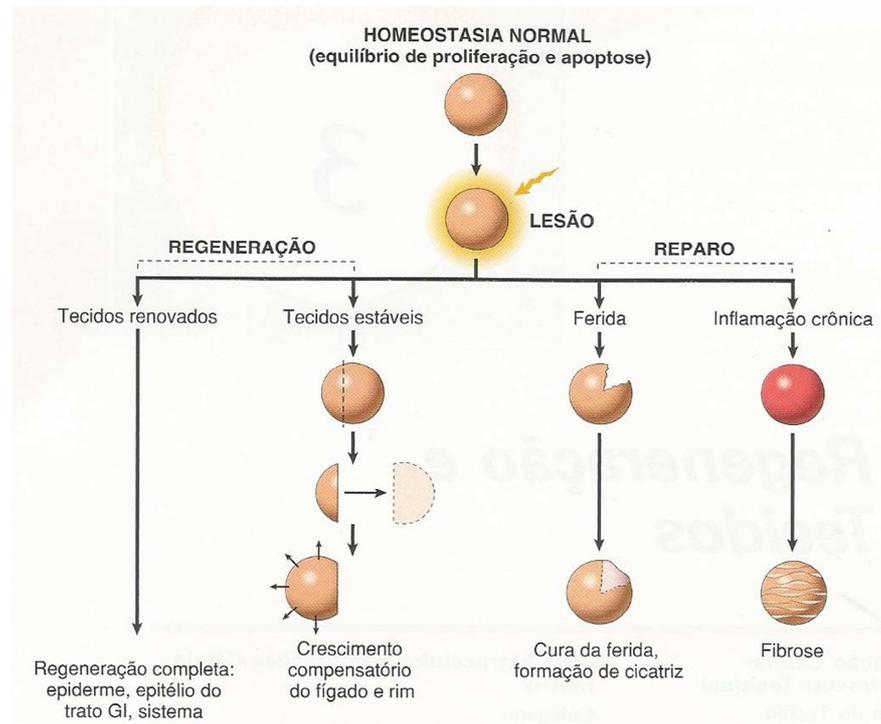
8.1 Cicatrização

A cicatrização de uma ferida consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstrução do tecido. Os avanços nos estudos em imunopatologia, genética, criação de modelos teóricos e engenharia tissular têm expandido o conhecimento sobre a cura de feridas e regeneração tissular. Neste contexto, o entendimento dos fatores que influenciam cada uma das etapas do processo de reparo permite aperfeiçoar a avaliação clínica, definir rumos para decisões de natureza terapêutica e desenvolver produtos que aperfeiçoam o processo (SHERRATT; DALLON, 2002; PAIVA, 2003; WILGUS, 2008; KONDO; ISHIDA, 2010; GROEBBER *et al.*, 2011). Devido ao alto índice de traumatismos que acometem animais e seres humanos há a busca por alternativas simples, econômicas e capazes de proporcionar condições ideais para a cicatrização (COELHO *et al.*, 2001; OBARA *et al.*, 2005).

A capacidade auto-regenerativa é um fenômeno universal nos organismos vivos. Nos organismos unicelulares está restrita a presença de enzimas responsáveis pela recuperação de elementos estruturais, como os constituintes do citoesqueleto, membrana e parede celulares, e de moléculas de alta complexidade como proteínas de alta complexidade estrutural, RNAs e DNA. Já em organismos superiores, além da recuperação de elementos estruturais e de moléculas de alta complexidade estrutural, ocorre o reparo de tecidos que pode se dar de duas formas: pela regeneração com a recomposição da atividade funcional do tecido ou pela cicatrização com o restabelecimento da homeostasia do tecido com perda da sua atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica (BALBINO *et al.*, 2005).

Quando ocorre a lesão às células e tecidos, inicia uma série de eventos incluindo inflamação, formação de um novo tecido (tecido de granulação) e sua remodelação, que finalmente leva, pelo menos, a reconstrução parcial da área danificada (CLARK, 1996; MARTIN, 1997). De um modo geral, esse processo pode ser dividido em regeneração e reparo (FIGURA 33). A regeneração resulta na restituição completa do tecido perdido ou lesado, já o reparo pode restaurar algumas estruturas originais, mas pode causar desarranjos estruturais. Em tecidos saudáveis, a regeneração ou o reparo ocorre praticamente após qualquer insulto que cause destruição tecidual e é essencial para a sobrevivência do organismo (GOSS, 1992; ROBBINS *et al.*, 2010).

Figura 33: Visão geral das respostas de cura após a lesão.



Fonte: Adaptado de ROBBINS *et al.*, 2010.

O processo de regeneração refere-se à proliferação de células e tecidos para substituir estruturas perdidas como, no caso de anfíbios, o crescimento de um membro amputado. Nos mamíferos, a capacidade de regeneração de órgãos e tecidos foi perdida, devido à ausência da formação de blastema, fonte de células para a regeneração, e à rápida resposta fibroproliferativa após a ferida (GOSS, 1992). Dessa forma o termo regeneração é geralmente aplicado a processos como crescimento hepático após ressecção parcial ou necrose, porém esses processos consistem em crescimento compensatório, em vez de uma regeneração verdadeira (FAUSTO; CAMPBELL, 2003). Tecidos com alta capacidade proliferativa, como o sistema hematopoiético e os epitélios da pele e do trato gastrointestinal, se autorenovam continuamente e podem regenerar-se após a lesão, já que as células-tronco desses tecidos não são destruídas (MIMEAULT *et al.*, 2007).

A cicatrização, ou processo de reparo, inicia-se imediatamente após a injúria e consiste nas seguintes fases: hemostasia e inflamação, proliferação, remodelagem da MEC e formação da cicatriz (maturação) (WILGUS, 2008; KONDO; ISHIDA, 2010). Todos esses eventos são sequenciais e sobrepostos, constituindo-se de um fenômeno harmônico, único e contínuo (TOGNINI *et al.*, 1998), envolvendo a migração de células inflamatórias, a síntese do tecido de granulação, a deposição e remodelação do colágeno e proteoglicanos (BIONDO,

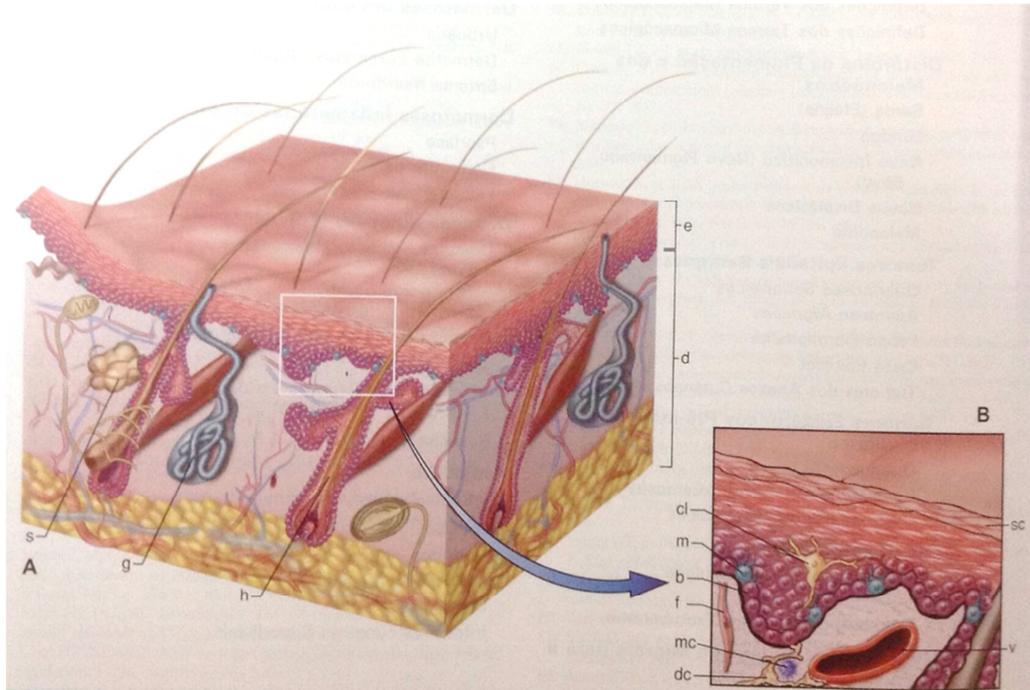
2000). O evento de reparo consiste mais frequentemente em uma combinação de regeneração e formação de cicatriz pela deposição de colágeno, evento que ocorre dependendo da habilidade de regeneração do tecido e da extensão da lesão. Entretanto, a formação de cicatriz constitui o processo predominantemente de reparo que ocorre quando a rede de matriz extracelular (MEC) é danificada por uma grave lesão. A inflamação crônica que acompanha a lesão persistente acompanha também a formação de cicatriz, devido à produção local de fatores de crescimento e citocinas que promovem a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno. O termo fibrose é usado para descrever a extensa deposição de colágeno que ocorre sob essas condições. Os componentes da MEC são essenciais para a cura de feridas porque eles fornecem a rede para migração celular, mantêm a correta polaridade celular para o rearranjo de estruturas estratificadas (OTT *et al.*, 2008) e participam da formação de novos vasos sanguíneos, processo chamado de angiogênese. Além disso, as células na MEC (fibroblastos, macrófagos e outros tipos celulares) produzem fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que são importantes para a regeneração e reparo (ROBBINS *et al.*, 2010).

8.2 A pele

Há pouco mais de um século, a pele era considerada principalmente uma barreira protetora passiva à perda de fluido e à lesão mecânica, nesta época o famoso patologista Rudolph Virchow, conhecido como pai da patologia, acreditava que a pele tinha como função ser um revestimento protetor das vísceras. No entanto, nas últimas décadas vários estudos mostraram que a pele é um órgão complexo no qual ocorre interações moleculares e celulares, precisamente reguladas que governam diversas respostas importantes ao meio ambiente (ROBBINS *et al.*, 2010).

Assim como outros órgãos complexos, a pele é composta por vários tipos celulares e estruturas interdependentes que são funcionalmente cooperativas (FIGURA 34). Entre esses tipos celulares estão as células epiteliais escamosas, também chamadas de queratinócitos, que além de produzirem a queratina, são os principais sítios para a biossíntese de moléculas solúveis (citocinas) que regulam as células epidérmicas adjacentes, assim como as células da derme. Os melanócitos são células localizadas na epiderme e são responsáveis pela produção da melanina, um pigmento marrom que protege contra a radiação ultravioleta (UV) (ROBBINS *et al.*, 2010).

Figura 34 – Representação da composição da pele.



Fonte: Adaptado de ROBBINS *et al.*, 2010. Em A detalhes da: (e) epiderme; (h) folículos pilosos; (g) glândulas sudoríparas; (s) glândulas sebáceas e derme subjacente (d). B) Detalhe mostrando (b) células basais; (m) melanócitos dendríticos contendo melanina; (cl) células de Langerhans; (v) pequenos vasos sanguíneos; (f) fibroblastos; (mc) mastócitos perivascular e (dc) dendrócitos, potencialmente importantes para na imunidade e no reparo da derme.

A pele é constantemente invadida por antígenos microbianos e não microbianos que são processados por células dendríticas dérmicas chamadas de células de Langerhans, que interagem com o sistema imune sistêmico ao migrarem para os linfonodos regionais. Tal função é exercida pelos dendrócitos na derme. Tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo respondem a esses sinais, incluindo uma subpopulação de linfócitos programada para se alojar na pele através da expressão do antígeno associado ao linfócito cutâneo (CLA). Como em qualquer lugar do corpo, as células T cutâneas são divididas em populações auxiliares (CD4+) e citotóxicas (CD8+). A resposta tecidual local às citocinas produzidas por estas células T é mediadora dos padrões microscópicos e das expressões clínicas das doenças inflamatórias e infecciosas cutâneas (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004; ROBBINS *et al.*, 2010).

As terminações nervosas e os processos axonais servem para nos alertar sobre os fatores físicos potencialmente lesivos presentes no meio ambiente e, recentemente, foi constatado que auxiliam na regulação das células imunocompetentes, indicando importante

modulação neuroimune (MURPHY, 1993). Entre a rede neural, estão as células de Merkel neuroendócrinas que residem na camada de células basais do tecido epitelial. Estas podem atuar como mecanorreceptores ou possivelmente apresentam uma função neuroendócrina na pele (JOHNSON, 2001).

A pele possui outros componentes anexos, entre eles estão as glândulas sudoríparas, que protegem contra as variações deletérias da temperatura corporal, os folículos pilosos que além de produzirem o pelo, abrigam os nichos protegidos de células-tronco epiteliais capazes de regenerar as estruturas epiteliais superficiais da pele rompidas por vários agentes hostis do meio interno e externo (BOBBINS *et al.*, 2010).

8.3 Mecanismo da cicatrização

As mudanças moleculares que ocorrem durante o processo de cicatrização se iniciam imediatamente após a injúria tecidual, sendo as plaquetas as primeiras a atuarem ao entrar na área da lesão iniciando o processo hemostático e inflamatório além de liberarem diversos mediadores responsáveis pela cascata de coagulação, assim como fatores de crescimento e quimiocinas (FURI; FURIE, 2008). Com a ativação das vias de coagulação ocorre a formação do coágulo sanguíneo na superfície da ferida. Este coágulo é formado principalmente por hemácias, fibrinas, fibronectinas e componentes do complemento e serve para conter o sangramento além de auxiliar a migração de células inflamatórias e imunes, que são atraídas por fatores de crescimento citocinas e quimiocinas liberadas na área da injúria (WERNER; GROSE, 2003). Dessa forma, a primeira fase do processo de reparo é a inflamação que, como visto mais detalhadamente no capítulo anterior, é uma reação complexa que envolve respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos e reações sistêmicas, sendo evidenciadas por sinais flogísticos como eritema, rubor, edema e dor (CONTRAN *et al.*, 2000).

Com a perda da integridade estrutural dos vasos ocorre a liberação de colágenos do tipo V e VII que são sinalizadores para a degranulação de plaquetas que liberam citocinas, Fator de Ativação Plaquetário (PAF), fibronectina e aminas vasoativas que causam inicialmente uma vasoconstrição seguida de uma vasodilatação e conseqüentemente o afluxo de sangue e proteínas séricas (ENOCH; LEAPER, 2007). Outras citocinas inflamatórias são liberadas pelos queratinócitos após o dano tecidual, entre elas estão IL-1 e TNF- α , que também são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos que, dentro de 24 horas após a

lesão aparecem nas bordas da incisão e migram para o coágulo, usando o arcabouço produzido pela fibrina. Os neutrófilos liberam enzimas proteolíticas que removem os restos necróticos e bactérias (WERNER; GROSE, 2003; BARRIETOS *et al.*, 2008; ROBBINS *et al.*, 2010). Assim, os inibidores de proteases têm como função proteger o tecido que não está envolvido no processo inflamatório. A eliminação dos neutrófilos ocorre por apoptose ou fagocitose pelos macrófagos (EMING *et al.*, 2007; TELLER; WHITE, 2009).

Nas primeiras 24 a 72 horas do início do processo de reparo ocorre a proliferação dos fibroblastos e das células endoteliais vasculares que dão origem a um tipo especializado de tecido chamado de tecido de granulação. Histologicamente este tecido se caracteriza pela presença de novos e pequenos vasos sanguíneos, derivados do processo de angeogênese, e de proliferação de fibroblastos. A migração de fibroblastos para o local da lesão é orientada por quimiocinas, TNF, PDGF, TGF- β , e FGF, enquanto que sua subsequente proliferação é desencadeada por diversos fatores de crescimento incluindo PDGF, EGF, TGF- β , FGF e as citocinas IL-1 e TNF (ROBBINS *et al.*, 2010).

A angeogênese é regulada por diversos fatores de crescimento, sendo o principal o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além de macrófagos, células endoteliais e proteínas da MEC. No tecido de granulação, os vasos neoformados são permeáveis e permitem a passagem de líquido e proteínas plasmáticas, apresentando frequentemente edema. Progressivamente este tecido invade o espaço da incisão sendo que a quantidade de tecido de granulação é proporcional ao defeito do tecido provocado pela ferida e pela intensidade da inflamação (MARTIN, 1997; ROBBINS *et al.*, 2010).

Após 48 a 96 horas do início da injúria, os neutrófilos são amplamente substituídos pelos macrófagos que predominam no local da lesão. Estes são responsáveis por remover os resíduos extracelulares, fibrina e outros materiais estranhos do local de reparo. Sua capacidade antimicrobiana provém além da fagocitose, pela produção de radicais reativos de oxigênio como o óxido nítrico (NO), oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No processo de cicatrização atuam como fonte primária de citocinas responsáveis por recrutamento e ativação celular, angiogênese, síntese de matriz e remodelação, sendo essenciais no processo de cicatrização (PARK; BARBUL, 2004; BROUGHTON *et al.*, 2006; ROBBINS *et al.*, 2010).

Ainda no período entre 24 a 48 horas grupos de células epiteliais movem-se da borda da ferida ao longo das margens cortadas da derme, ainda que inicialmente com pouca proliferação celular, depositando à medida com que se movem componentes da membrana basal. Esse movimento lamelipodial de ceratinócitos ocorre de forma centrípeta e com isso

produz uma fina camada epitelial em abaixo da superfície da crosta que fecha a ferida (KUMAR *et al.*, 2006; NODDER; MARTIN, 1997). Quando ocorre o contato entre os ceratinócitos após a migração é induzida uma sinalização para que essas células cessem seu esforço migratório (LAWRENCE, 1996). A subsequente proliferação celular epitelial aumenta a espessura dessa camada epidérmica. Os macrófagos estimulam a produção de FGF-7 e IL-6 pelos fibroblastos, que junto com outros mediadores de reepitelização como o HGF e HB-EGF aumentam a migração e a proliferação de ceratinócitos. A grande importância do processo de reepitelização está em reestabelecer a barreira externa impedindo a perda de fluido e com isso prevenir a invasão de microorganismo.

Ao mesmo tempo em que ocorre a epitelização, as fibrilas colágenas tornam-se mais abundantes. Inicialmente, é formada uma matriz provisória formada por fibrina, fibronectina plasmática e colágeno tipo III, que posteriormente será substituída por uma matriz composta principalmente por colágeno tipo I. A substituição do tecido de granulação por uma cicatriz envolve alterações na composição da MEC. É muito importante no reparo tecidual o equilíbrio entre síntese e degradação de componentes da MEC que resulta no remodelamento do tecido conjuntivo. Alguns fatores de crescimento que estimulam a síntese de colágeno e outras moléculas do tecido conjuntivo são responsáveis também pela regulação da síntese e atividade de enzimas chamadas de metaloproteinases de matriz (MMP). A degradação do colágeno e de outras proteínas da matriz é realizada por essas enzimas. Em casos de feridas muito extensas ocorre o processo de contração da ferida. Essa contração ocorre pela formação, na margem da ferida, de uma rede de miofibroblastos que expressam α -actina de músculo liso e vimentina que possuem características ultraestruturais de células musculares lisas que se contraem na ferida e produzem grandes quantidades de componentes da MEC. A contração ajuda a fechar a ferida diminuindo a lacuna entre as margens dérmicas reduzindo assim a área de superfície da ferida (ROBBINS *et al.*, 2010).

Dessa forma, a chamada de fase de maturação ou remodelamento tecidual é marcada pela transição de tecido de granulação para a reorganização e maturação das fibras colágenas, caracterizado pela remodelação do colágeno, além de apresentar tecido conjuntivo, poucos vasos sanguíneos e contração da ferida (SCHREMEL *et al.*, 2010; KONDO; ISHIDA, 2010). Por tanto, a cicatriz formada ao final do primeiro mês é constituída por tecido conjuntivo acelular destituído de infiltrado inflamatório e recoberto por epiderme intacta (ROBBINS *et al.*, 2010).

Atualmente a busca por produtos naturais com a finalidade de melhorar e acelerar o processo cicatricial vem aumentando, tanto por motivos estéticos quanto principalmente por

motivos medicinais, a exemplo da cicatrização cutânea retardada em indivíduos que sofrem de diabetes. Os caramujos são animais capazes de produzir uma secreção glicoproteica produzida através de glândulas localizadas em toda a superfície do seu corpo, que possui ação antibacteriana comprovada e que participa da própria imunidade inata desses animais.

Martins e colaboradores publicaram em 2003 o trabalho que avalia a macroscopicamente e histologicamente os efeitos reparadores do muco do caramujo *Achatina fulica*, utilizando-o sob as formas de pomada e puro. Os autores mostraram que o reparo cutâneo das feridas tratadas tanto com o muco quanto com a pomada feita com o muco de *Achatina fulica* ocorreu em menor tempo do que o grupo controle, sendo o efeito da pomada a base de muco ainda melhor. Este trabalho serviu de base para avaliar se a lectina AFL purificada do muco da mesma espécie de caramujo pode estar relacionada a essa ação cicatrizante do muco.

9. MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Animais

Para os experimentos de cicatrização *in vivo* foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) Swiss machos, com 8 a 10 semanas de vida, com peso aproximado de $35,0 \pm 5,0$ g, obtidos a partir do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – Campus do Pici. Os animais foram mantidos na hospedaria para animais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará durante os procedimentos experimentais, permanecendo em macroambiente controlado com temperatura aproximadamente de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, umidade $55 \pm 10\%$ e com fornecimento de água e ração específica *ad libitum* até a realização dos procedimentos experimentais. Os experimentos foram realizados em colaboração com o professor Edson Holanda Teixeira no Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS).

9.2 Estratégia experimental e formulação dos tratamentos tópicos

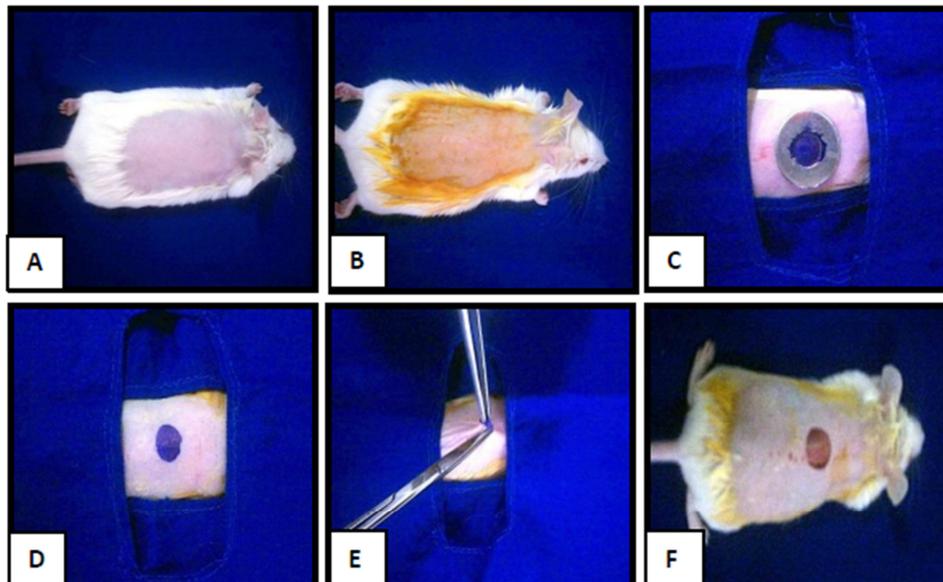
Inicialmente os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos (n = 12) e organizados de acordo com o tratamento aplicado. A lectina AFL purificada pela cromatografia de interação hidrofóbica foi dissolvida em salina 150 mM a uma concentração de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O grupo controle foi realizado utilizando salina 150 mM. Todas as soluções

utilizadas para tratamento foram diluídas em NaCl 150 mM para manter a isotonicidade fisiológica celular dos animais. Foi realizado o processo cirúrgico para avaliar a atividade cicatrizante da lectina de AFL e todas as lesões foram avaliadas clinicamente diariamente do primeiro ao 12º dia pós-cirúrgico (P.C.) e os resultados foram comparados com o grupo controle.

9.3 Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi realizado inicialmente anestesiando os camundongos com cloridrato de xilazina 2% (10 mg.kg^{-1}) e cloridrato de ketamina 10 % (115 mg.kg^{-1}), por via subcutânea (HALL; CLARKE, 1991). Após a anestesia foi realizado a tricotomia e a anti-sepsia da região dorsal torácica com iodopovidona e solução salina estéril NaCl 150 mM. A pele foi demarcada com caneta dermatográfica utilizando um molde metálico para delimitar a área ($1,0 \text{ cm}^2$). A ferida cutânea foi produzida pela incisão da pele através da lâmina de bisturi número 15. A tela subcutânea foi divulsionada com tesoura de pontas tipo fina/fina e pinça de dissecação, até sua total ressecção (FIGURA 35).

Figura 35: Representação do procedimento cirúrgico em camundongos.



Fonte: Adaptado de NETO, 2011. A) Tricotomia; B) Anti-Sepsia; C) Padronização da Lesão; D) Demarcação da Lesão; E) Ressecção do fragmento de pele; F) Lesão experimental realizada.

Os experimentos foram realizados objetivando diminuir ao máximo qualquer incômodo ao animal. Todos os procedimentos seguiram às normas aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, de acordo com o guia de Princípios Internacionais de Pesquisas Biomédicas Envolvendo Animais e o trabalho foi realizado obedecendo às normas do *Canadian Council Animal Care (CCAC)*.

9.4 Tratamento e avaliação macroscópica da atividade cicatrizante

Logo após a realização do procedimento cirúrgico, as lesões de cada grupo foram tratadas topicamente com suas respectivas soluções, em doses diárias únicas de 20 µg.100 uL⁻¹ durante toda a realização do experimento.

Todas as lesões foram avaliadas clinicamente uma vez ao dia, do 1º até o 12º dia de pós-cirúrgico (P.C.), onde foram evidenciados sinais flogísticos como: edema (no leito e nas bordas da lesão), hiperemia, sangramento, presença de crosta, tecido de granulação, exsudato e tecido cicatricial, além da mensuração da área lesionada com o uso de um paquímetro manual convencional. Nessas análises o grupo tratado com a lectina foi comparado com o grupo controle tratado com salina.

Para a análise da área das lesões foi realizado o cálculo de acordo com a equação descrita por PRATA e colaboradores (1998):

$$A = \pi \times R \times r;$$

onde **A** = área, **R** = raio maior e **r** = raio menor da lesão. A proporção de contração e taxa de reepitelização da lesão foi avaliada de acordo com as fórmulas segundo o método descrito por GILMAN (1994):

$$CR = \Delta \text{ área} \div \Delta \text{ tempo}$$

$$2ER = \Delta \text{ área} \div \Delta \text{ tempo}$$

onde **CR** = proporção de contração, **ER** = proporção de epitelização, **Δ comprimento** = variação do comprimento da lesão, **Δ tempo** = variação do tempo. Os dados foram considerados em milímetros por dia (mm.dia⁻¹). A variação dos comprimentos foi calculada de acordo com as seguintes variações de tempo: 0 – 2 dias P.C.; 2 – 7 dias P.C. e 7 – 12 dias P.C.

9.5 Avaliação Histopatológica

Para a avaliação histopatológica, os animais foram anestesiados como previamente descrito e amostras do tecido lesionado foram coletadas no 2º, 7º e 12º dia pós-cirúrgico. Nesses dias determinados, três animais foram retirados aleatoriamente dos grupos experimentais e após a realização das biópsias, foram sacrificados por deslocamento cervical. As amostras de tecido foram fixadas em formaldeído (10% v/v) preparado em tampão PBS 0,01 M pH 7,2 e foram submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em parafina. Foram realizados cortes em micrótomo de secções de 5 µm que foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e por Tricrômico de Masson (MICHALANY, 1991). Posteriormente foram montadas lâminas contendo os cortes tratados e corados e estas foram visualizadas em objetivas de 4, 10 e 40 x em microscópio *Leica* modelo DM 500 e analisados histopatologicamente.

9.6 Avaliação Estatística

Os valores das áreas das lesões experimentais foram expressos em gráficos utilizando o Pacote Estatístico *GraphPad Prism*® versão 3.0 para *Microsoft Windows*®, sendo os resultados apresentados como média ± desvio padrão ($M \pm d$), sendo utilizado também a análise do Test *t de Student*. A comparação entre as médias dos grupos experimentais foi realizada utilizando também o pacote estatístico *Statsoft Statistica*® versão 6.0 para *Microsoft Windows*® 95/98/ME/XP/VISTA, onde foi considerado estatisticamente significantes os valores $p < 0,05$.

Os dados relacionados às medidas de proporção de contração (CR) e epitelização (ER) foram avaliados pelo teste de análise de variância (one-way ANOVA) com o post-teste de Tukey presentes nos pacotes estatísticos *GraphPad Prism*® versão 3.0 para *Microsoft Windows*®, considerando valores estatisticamente significantes $p < 0,05$. Os dados de características clínicas foram testados quando à possibilidade de interveniência do tratamento utilizado, utilizando-se o teste do Qui-quadrado (X^2) do programa *Microsoft Excel* proveniente do pacote *Microsoft Office 2007*® para *Microsoft Windows*®, sendo aceitos como estatisticamente significantes os valores com $p < 0,05$.

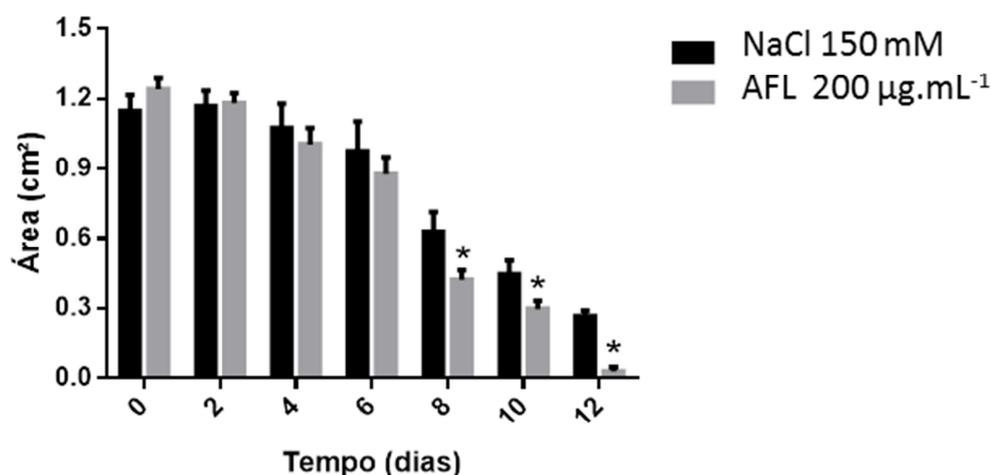
10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 Avaliação da atividade cicatrizante da AFL

A partir do primeiro dia da cirurgia e durante todo o experimento foi realizada a avaliação macroscópica dos animais durante os 12 dias após o processo cirúrgico tanto no grupo tratado com a lectina purificada do muco de *Achatina fulica* quanto do grupo controle tratado com NaCl 150 mM. Durante este período de observações, foi avaliada também a presença de sinais flogísticos inerentes do processo de cicatrização como: edema no leito e nas bordas das lesões experimental, hiperemia, sangramento, aspectos da crosta formada, tecido de granulação, exsudação e tecido cicatricial. Durante todo o experimento foi realizada diariamente a mensuração da área ferida.

Foi observado que o tratamento com a lectina AFL induziu uma diminuição na área das lesões a partir do 4º dia quando comparado ao grupo controle tratado com NaCl 150 mM, sendo esta diferença significativamente maior a partir do 8º dia (FIGURA 36).

Figura 36 – Gráfico representativo da evolução das áreas das lesões nos grupos experimentais.



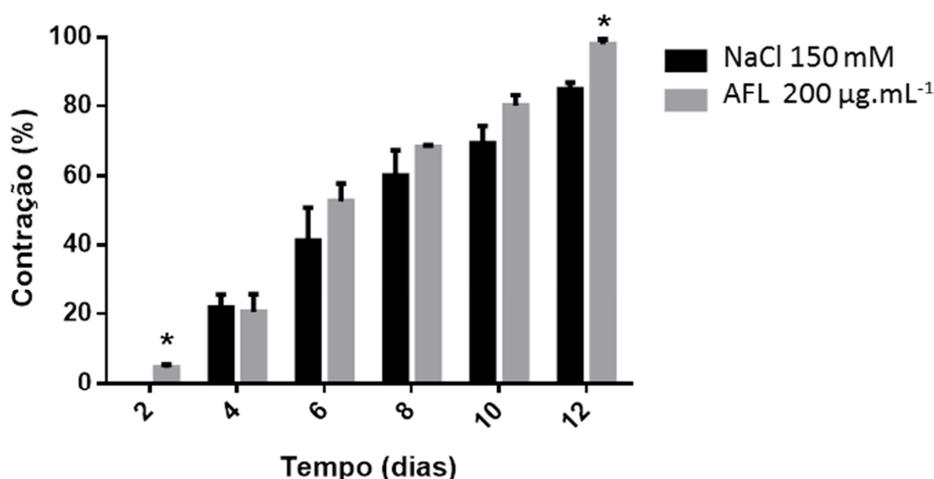
Fonte: Elaborado pela autora. (valores em média \pm E.P.M.). (*) $p < 0,05$ para teste t em relação à NaCl.

De acordo com a capacidade de formação de tecido cicatricial, foi verificado que a ferida tratada com a lectina AFL foi capaz de iniciar o processo de formação deste tecido logo a partir do 2º dia pós-cirúrgico, o que não ocorreu quando a lesão foi tratada apenas com NaCl, como visto na figura 37. Neste gráfico podemos observar que a porcentagem de

formação de tecido epitelial, ou reepitelização, de acordo com os dias pós-cirúrgicos foi sempre maior nas feridas tratadas com a lectina, no entanto, a diferença se mostrou novamente significativa estatisticamente no 12º dia.

A fase inflamatória da cicatrização ocorre geralmente durante o período de 48 horas após a injúria. Dessa forma, os dados obtidos nos experimentos de cicatrização corroboram com os da ação anti-inflamatória desta lectina, pois no período inicial de cicatrização as lesões tratadas com a lectina obtiveram maior porcentagem de epitelização no segundo dia de tratamento, sendo essa ação anti-inflamatória da AFL importante para o processo de cicatrização.

Figura 37 – Gráfico representativo da porcentagem de epitelização das lesões nos grupos experimentais.



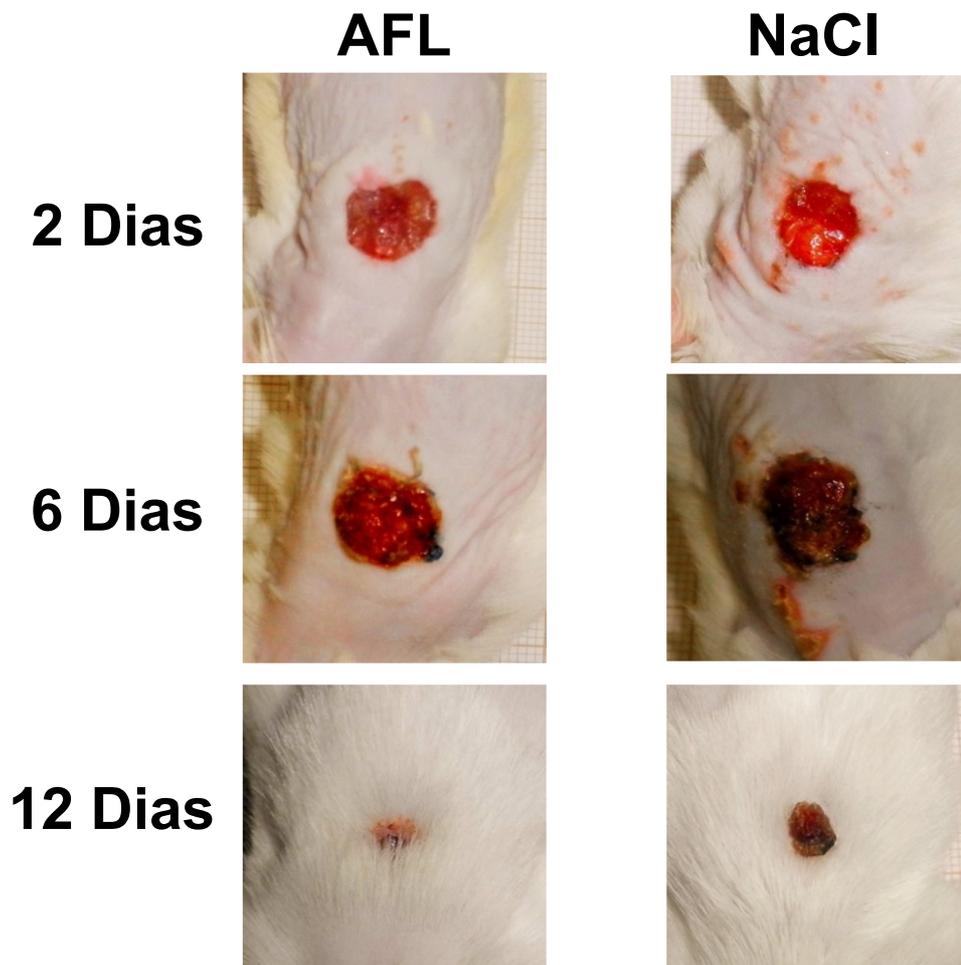
Fonte: Elaborado pela autora. (valores em média \pm E.P.M). (*) $p < 0,05$ para teste t em relação a NaCl.

Corroborando com os resultados mostrados no gráfico da figura 37, é possível visualizar estes dados pelas fotografias na figura 38, que mostram a evolução do tratamento das feridas tanto no grupo tratado com a lectina AFL quanto no grupo controle tratado com o NaCl 150 mM. Estas fotografias mostram que durante o tratamento com a lectina e o controle é possível observar uma maior rapidez no processo de cicatrização no tratamento com a lectina. Comparando as fotos do segundo dia pós-cirúrgico nos dois grupos é possível observar o início do processo de epitelização no grupo tratado com a lectina e a ausência desse processo no grupo controle.

Com referência aos sinais flogísticos observados, vimos que no grupo tratado apenas com 150 mM de NaCl a ferida se mostra mais avermelhada e com ausência de

formação de crosta, diferente da foto do animal tratado com a AFL onde é possível ver o início da epitelização mostrando uma aceleração no processo de cicatrização (FIGURA 38). Nas fotos do 6º dia apesar do nível de epitelização do grupo tratado com AFL ainda ser maior do que o grupo controle, os dados observados nas fotos não mostram muita diferença, o que corrobora com os gráficos anteriores (FIGURA 36 e 37) que mostra que do 6º dia as diferenças entre grupo tratado com a lectina e o grupo controle não são significativas. Já ao comparar as fotos dos grupos no 12º dia é possível observar nitidamente a diferença na rapidez do processo de cicatrização do grupo tratado com a lectina. Na foto do animal tratado com AFL já houve o total desprendimento da crosta e reorganização tecidual mostrando o fim do processo, o que não ocorre no grupo controle que ainda apresenta a crosta anexada ao local da ferida.

Figura 38 – Evolução do processo cicatricial das lesões tratadas com AFL $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e com NaCl 150 mM nos dias 2, 7 e 12 P.C.

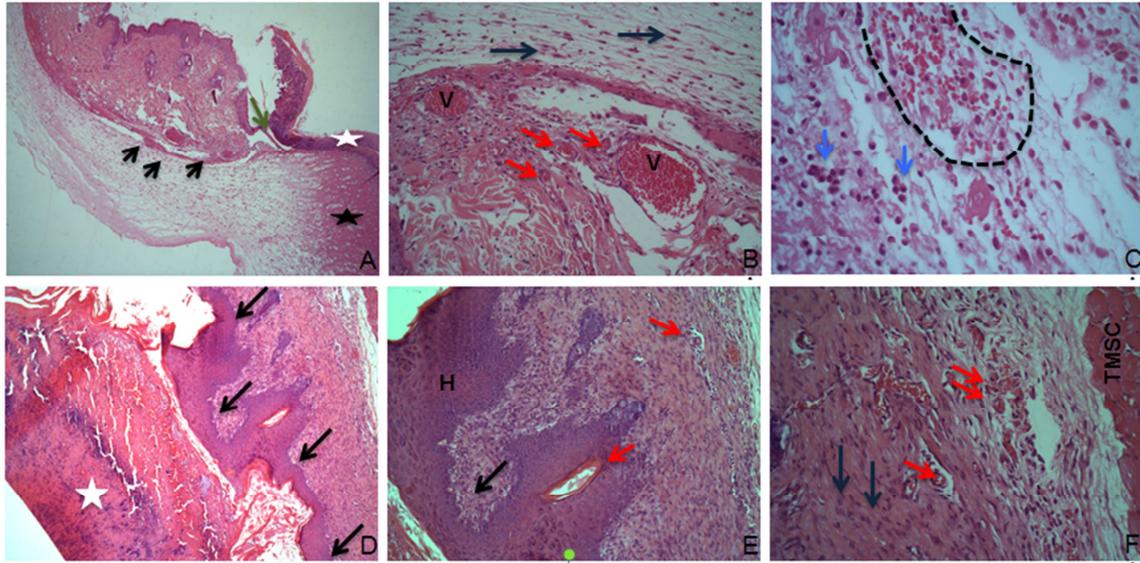


O experimento de reversão da atividade cicatrizante com o açúcar de maior inibição da lectina AFL foi realizado também em parceria com o Laboratório LIBS. Para este ensaio de reversão, a lectina foi pré-incubada com o açúcar de maior afinidade por 1 hora a 37 °C e após este tempo foi utilizada no tratamento tópico de lesões experimentais. Os resultados mostraram que a atividade cicatrizante da lectina AFL está relacionada ao sítio de ligação a carboidrato já que seu efeito foi inibido quando a lectina estava na presença do açúcar de maior afinidade (dados não apresentados).

10.2 Avaliação Histopatológica

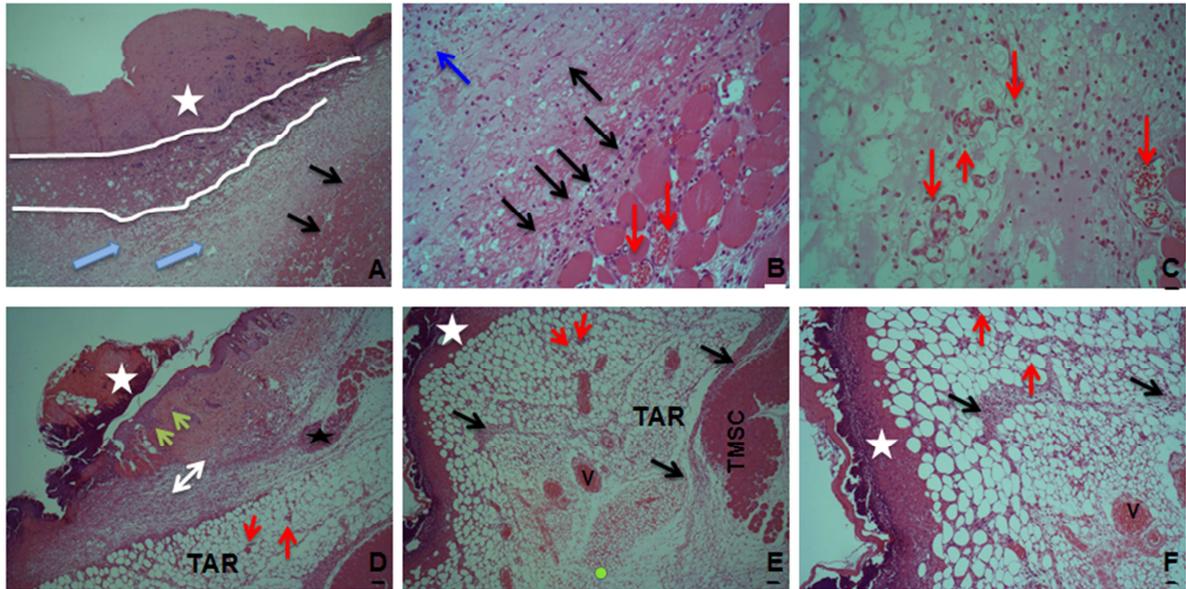
A avaliação histopatológica foi realizada após serem colhidos fragmentos de pele nos dias 2, 7 e 12 após o processo cirúrgico. Comparando as fotomicrografias obtidas pelas pranchas da lesão tratada diariamente com a lectina AFL $20 \mu\text{g} \cdot 100 \text{uL}^{-1}$ com o grupo controle tratado diariamente com salina 150 mM, foi observado que no 7º dia após o processo cirúrgico a lesão tratada com a lectina já apresentava reepitelização nas bordas da lesão, (setas verdes na figura 39 A) com uma região de fibrose, enquanto que no 7º dia de tratamento com salina o que se observou foi uma formação de crosta com fibrose, mas sem reepitelização (figura 40 A). No tratado com salina 150 mM foi observado o atraso no processo de cicatrização onde no 7º dia P.C. ainda foi observado resposta inflamatória aguda e tecido de granulação ainda no início de proliferação.

Figura 39 – Fotomicrografias de animais tratados com AFL durante o 7º e 12º dia.



Fonte: Elaborada pela autora. (A) Representa uma lesão de 7 dias. Observa-se reepitelização nas bordas da lesão (seta verde) com presença de crosta delgada no leito da lesão. As setas pretas indicam o músculo erector do pelo. A estrela preta evidencia região extensa de fibrose na derme. (B) Detalhe da foto anterior. Magnificação 200x. Região de transição, na qual, vasos congestos (V) estão envoltos por deposição recente de colágeno. Notar a presença de neovascularização (setas vermelhas) e fibroblastos alinhados (setas azuis). (C) Magnificação de 400x. Observa-se micro-hemorragia (delimitação pontilhada) com presença de monócitos e polimorfonucleares (setas azul claro). Após 12 dias, observa-se em (D) a reestruturação do epitélio de revestimento (setas pretas) com presença de crosta (estrela branca). (E) Detalhe da foto anterior. Magnificação 100x. Constatando hiperplasia epidérmica (H) com papilas dérmicas resultantes (seta preta). (F) Magnificação 400x. Detalha-se a presença de fibroblastos ativos (setas azuis) e vasos resultantes do processo de angiogênese (setas vermelhas).

Figura 40 – Fotomicrografias de animais tratados com NaCl 150 mM durante o 7º e 12º dia.



Fonte: Elaborada pela autora. (A) Representa uma lesão de 7 dias com magnificação de 40x em microscopia de luz. Observa-se presença de crosta (estrela branca) com fibrose (região entre linhas brancas). Há região edemaciada na derme (setas azul-claro) com presença de fibroblastos alinhados para tração junto a tela muscular subcutânea (setas pretas). B e C representa a área caracterizada em A com maior aumento (100 e 400x respectivamente). Angiogênese (setas vermelhas), células inflamatórias (seta azul). (D) Representa uma lesão de 12 dias com magnificação em 40x em microscopia de luz. Há a presença de crosta (estrela branca) sobre início de reconstrução epidermal (setas verdes) com presença de hiperplasia epidérmica. (E) Detalhe da foto anterior. Magnificação 100x e (F) Magnificação 400x.

Sabe-se que o processo de reparo consiste em uma sequência de eventos que ocorrem de forma ordenada, contínua e harmônica, sendo estes eventos a hemostasia e inflamação, proliferação, remodelagem da MEC e por fim a formação de cicatriz, processo também chamado de maturação. Dessa forma, um dos principais e imprescindíveis eventos que ocorre para que haja o processo de reparo do tecido danificado é o processo de inflamação e a migração de células inflamatórias, além da síntese do tecido de granulação, deposição e remodelação do colágeno e proteoglicanos (WILGUS, 2008; KONDO; ISHIDA, 2010; TOGNINI *et al.*, 1998; BIONDO, 2000).

Durante o processo inflamatório ocorre a migração de leucócitos, sendo os mais importantes os neutrófilos e os macrófagos, para o local da injúria e os mesmos são ativados para eliminar os agentes agressores, sendo este um dos principais eventos para um rápido e eficiente processo de cicatrização. Esse aceleração do processo de reparo ocorre devido os neutrófilos exercerem o trabalho de “limpeza” da ferida ao realizarem a fagocitose dos restos

celulares e de bactérias presentes no local da injúria e dessa forma acelerando a fase fibroplástica (TELLER; WHITE, 2009; WILD *et al.*, 2010).

O prolongamento da fase inflamatória influencia a fase de fibroplasia, sendo que quanto mais prolongada é a fase inflamatória mais tardiamente começa o processo de deposição dos fibroblastos na região da lesão (ARAUJO *et al.*, 1998). À medida que o processo de cicatrização progride ocorre a diminuição gradual das células inflamatórias. Os eventos que ocorrem durante o processo de inflamação induzem ao debridamento da ferida, que uma vez concluído, o processo cicatricial entra em fase construtiva de reparo para a formação tecidual, denominada fase fibroblástica ou proliferativa (TELLER; WHITE, 2009; WILD *et al.*, 2010). Essa fase tem início após o 3º ou 4º dia após a injúria e se caracteriza pela migração de fibroblastos, deposição de MEC e formação de tecido de granulação. Durante esse processo a matriz provisória de fibrina é substituída por tecido de granulação neoformado e o estágio final dessa fase é representado pela epitelização.

Os leucócitos também são capazes de produzirem fatores de crescimento que ajudam no processo de reparo. Os mastócitos são responsáveis por secretar grandes quantidades de fatores de crescimento, incluindo TGF- α e β , sendo que o TGF- β é um dos principais responsáveis tanto pela regulação do reparo tecidual, assim como na estimulação da angiogênese, na formação do tecido de granulação, na regulação da síntese de colágeno por fibroblastos e no desenvolvimento da fibroplasia (RHETT *et al.*, 2008; MURPHY *et al.*, 2011). Os macrófagos e mastócitos estão presentes em tecidos onde está situado o processo inflamatório e quando ativadas podem liberar diferentes mediadores que são capazes de iniciar a resposta inflamatória (McGREAL *et al.*, 2004; KONDO; ISHIDA, 2010; BITENCOURT *et al.*, 2008). Além disso, possuem em sua superfície ligantes como glicoproteínas e glicolípídeos que são alvos adequados para a interação com lectinas (ALENCAR *et al.*, 2007). Recentemente observou-se o efeito de lectinas de plantas e algas sobre mastócitos constatando que essas biomoléculas são capazes de induzir a produção de histamina via células do sistema imune (LOPES *et al.*, 2005), mas nenhum trabalho fez referência a atividade cicatrizante de lectina animal.

Como mostrado no capítulo anterior dessa tese, a lectina isolada neste trabalho apresentou atividade anti-inflamatória em modelos de teste da Formalina inibindo a formação de edema a partir da segunda hora após administrado o agente inflamatório. A lectina também mostrou ser capaz de inibir a migração de neutrófilo mostrado pelo teste de quantificação de MPO. Esses conjunto de resultados obtidos somados ao fato da lectina ser capaz de acelerar o

processo de cicatrização mostram que a lectina atua diretamente no processo inflamatório, fase inicial e essencial para o processo de cicatrização.

Em relação à atividade cicatrizante de lectinas, atualmente na literatura temos trabalhos que mostraram atividades de lectinas de plantas capazes de atuar no processo de cicatrização. A lectina KM+ isolada de jaca da espécie *Artocarpus integrifolia* apresentou atividade capaz de acelerar o processo de reparo do epitélio corneano, sendo uma possível ferramenta no tratamento de lesões oculares (CHAHUD *et al.*, 2009). Já a lectina BVL isolada de *Bauhinia variegata* e sua forma recombinante (rBVL I) possuem capacidade pró-cicatrizante, possivelmente relacionada a atividade de mastócitos residentes que agem como agentes quimiotáticos, atuando no recrutamento de neutrófilos. Ou seja, nos dois casos essas lectinas possuem atividade pro-inflamatória por um mecanismo que envolve a intensa migração de neutrófilos nas primeiras horas após a injúria tecidual, o que não foi mostrado na atividade pró-cicatrizante da lectina AFL. Pelo contrário, o teste de quantificação de MPO, enzima é encontrada nos grânulos azurofílicos de neutrófilos, mostra que a lectina AFL provocou uma diminuição de migração de neutrófilos, o que pode acarretar numa maior rapidez da atividade inflamatória e por consequência uma maior aceleração no processo cicatrizante.

Dessa forma este trabalho apresenta a primeira atividade pró-cicatrizante de uma lectina animal. Com os resultados obtidos mostramos que ao tratar a ferida com a lectina AFL o processo de cicatrização foi mais rápido, pois a atividade anti-inflamatória da lectina permitiu uma maior rapidez no processo inflamatório permitindo uma reepitelização em menor tempo. Esta análise da capacidade cicatrizante da lectina foi observada mesmo no 7º dia de tratamento.

CAPÍTULO V – CONCLUSÃO GERAL

11. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou o isolamento e a caracterização de uma lectina isolada do muco de *Achatina fulica*. A AFL é uma metaloproteína cálcio dependente, com peso molecular aparente de aproximadamente 70 kDa, com afinidade por lactose/galactose além de reconhecer ácido siálico, mostrando maior afinidade ao KDN do que ao ácido Nacetilneuramínico. Esta lectina mostrou ser ativa em pH básico, sendo seu pH ótimo o 8 e ser estável entre as temperaturas de 30° a 40°, perdendo completamente sua atividade ao atingir a temperatura de 70°C. Na avaliação de toxicidade desta lectina, a mesma não mostrou ser tóxica em teste contra náuplios de *Artemias* sp.

Com os resultados obtidos conclui-se que a lectina do muco de *Achatina fulica* apresenta efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção química, envolvendo componentes da dor no sistema nervoso periférico, destacando-se seu efeito na dor de natureza inflamatória. A AFL apresentou ação anti-inflamatória com participação do domínio de reconhecimento a carboidrato. A lectina não apresentou efeito em modelo de nocicepção térmica o que comprova que sua atuação é no processo de inflamação, também mostrado na atividade cicatrizante em feridas cutâneas cirurgicamente induzidas, sendo esta a primeira lectina animal a apresentar atividade cicatrizante.

Por fim, os resultados obtidos nesta tese comprovam a grande importância de se estudar macromoléculas em animais na busca por novos fármacos e novas terapias. A lectina em questão, por se ligar à açúcares que são expressos em grandes quantidades em células tumorais, pode servir futuramente como um marcador biológico para a detecção de células malignas. Os estudos sobre inflamação mostram outra possível utilização dessa lectina e até mesmo a aplicação da lectina purificada como biofármaco anti-inflamatório e pró-cicatrizante.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, S.J.; CORRETTE, S.E.; ROSENBERG, H.F.; BENNETT, J.C.; MASTRIANNI, D.M.; NICHOLSON-WELLER, A.; WELLER, P.F.; CHIN, D.T.; TENEN D.G. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot – Leyden crystal protein (lysophospholipase), **J. Immunol.**, v.150, p.456– 468, 1993.
- AKCAY, F., TAYSI, S., USLU, C., DOGRU, Y.G.K. Levels of Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 and Total Sialic Acid in Serum of Patients with Laryngeal Cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**. v.31, n.12, p.584-588, 2001.
- ALENCAR, N. M. N.; ASSREUY, A. M. S.; HAVT, A.; BENEVIDES, R. G.; MOURA, T. R.; SOUSA, R. B.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; CAVADA, B. S. *Vatairea macrocarpa* (*Leguminosae*) lectin activates cultured macrophages to release chemotaxis mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, v. 374, p. 275- 282, 2007.
- ALLEY, W.R, Jr, VASSEUR, J.A.; GOETZ, JÁ.; SVOBODA, M.; MANN, BF; MATEI, D.E.; MENNING, N.; HUSSEIN, A.; MECHREF, Y.; NOVOTNY, M.V. N-linked glycan structures and their expressions change in the blood sera of ovarian cancer patients. **J Proteome Res**. v.11, n.4, p. 2282–2300, 2012.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, São Paulo, v.1000, p.40-56, 2004.
- ALPHEY, M.S.; ATTRILLI, H.; CROCKER, P.R.; VAN AALDEN, D.M. High resolution crystal structures of Siglec-7. Insights into ligand specificity in the Siglec family. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 3372–3377, 2003.
- ALTIER, C.; ZAMPONI, G. W. Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type. **Trend Pharmacol Sci** v. 25, p. 465-469, 2004.
- AMBROSI, M.; CAMERON, N.R.; DAVIS, B.G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Org. Biomol. Chem.**, v.3, p.1593-1608, 2005.
- ANGATA, T.; VARKI A. Chemical Diversity in the Sialic Acids and related α -Keto Acids: An Evolutionary Perspective. **Chemical Reviews**. v.102, n.2, p.439-469 2002.
- ARAÚJO, C. F. R.; SOUZA FILHO, Z. A. de; GRECA, F. H.; GUERREIRO, M. M. C. P. M.; LEITE, L. A.; MANSUR, A. E. C.; KANTOR, D. C.; NASSIF, A. E. Efeitos do Agarol e do Trigliceril sobre a cicatrização de pele, estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.** v. 13, n .4, p. 232-237, 1998.
- ASSREUY, A.M.S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; de SOUZA, M.L.P.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Antiinflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from brazilian beans. **Mediators of inflammation**, v. 6, p.1-10, 1997.

ASSREUY, A.M.; FONTENELE, S.R.; PIRES, A.F.; FERNANDES, D.C.; RODRIGUES, N.V.; BEZERRA, E. H.; MOURA, T.R.; DO NASCIMENTO, K.S.; CAVADA B.S. Vasodilator effects of diocleinae lectins from the canavalia genus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, v.380, n.6, p.509-21, 2009.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 41, n.1, 2005

BALZARINI, J.; SCHOLS, D.; NEYTS, J.; VAN DAMME, E.J.; PEUMANS, W.J.; DE CLERCQ, E. Alpha-(1-3)- and alpha-(1-6)-D-mannose-specific plant lectins are markedly inhibitory to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. v.35, n.3, p. 410-416, 1991.

BALZARINI, J.; NEYTS, J.; SCHOLS, D.; HOSOYA, M.; VAN DAMME, E.J.; PEUMANS, W.J.; DE CLERCQ, E. The mannose specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine) n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. *Antiviral Research*. v.18, n.2, p. 191-207, 1992.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S.; BREM, H.; TOMICCANIC, M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. v. 16, n. 5, p. 585-601, 2008.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M. A percepção da dor. **In:** KANDEL, E. R. CCHWARTZ, J.H.; JESSEN, T. M. Princípios da neurociência. Barueri, SP: Manole, p. 472-491, 2003.

BAUHMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. *Imunol today*, v. 15, n. 2, p. 74-80, 1994.

BENETEAU, J.; RENARD, D.; MARCHÉ, L.; DOUVILLE, E.; LAVENANT, L.; RAHBÉ, Y.; DUPONT, D.; VILAINE, F.; DINANT, S. Binding properties of the N-acetylglucosamine and high-mannose n-glycan pp2-a1 phloem lectin in arabidopsis. *Plant Physiol*. v.153, n.3, p.1345-61, 2010.

BERG, T.K.; VAN DER MERWE, P.A.; WATT, S.M.; VARKI, A. *Glycobiology*, v.8, 1998.

BESSON, M. J.; DICKENSON, A. The pharmacology of pain. **Berlin: Springer-Verlag**, Baltimore, v.130, p.21-41, 1997.

BHANDARI, P.; BATEMAN, A.C.; MEHTA, R.L.; PATEL, P. Mucosal expression of cyclooxygenase isoforms 1 and 2 is increased with worsening damage to the gastric mucosa. *Histopathology*, v. 46, n. 3, p. 280-286, 2005.

BIANCHET, M.A.; ODOM, E.W.; VASTA, G.R.; AMZEL, L.M. A novel fucose recognition fold involved in innate immunity. *Nat Struct Biol*, v. 9, p. 628-634, 2002.

BIONDO, S. Role of resection and primary anastomosis of the left colon in the presence of peritonitis. *Br J Surg.*, v. 87, p. 1580-4, 2000.

BIRD, G.W.G. Discussion paper: Invertebrate agglutinin in general. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.234, p.51-54, 1974.

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

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G.; Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.**, v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.

BROUGHTON, G 2nd.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg.**, v. 117, n.7, p. 12S-34S, 2006.

BURATINI, S.V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Bulletin of Environmental **Contamination and Toxicology**, v.73, p. 878, 2004.

CASSO-LOPES, B.P. **Los animales usados en la medicina popular mexicana.** Ciudad de México: Imprenta Universitária, 2007. 126 p.

CASH, H.L.; WHITHAM, C.V.; BEHRENDT, C.L.; HOOPER, L.V. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. **Science**, v.313, n.5790, p.1126-1130, 2006.

CHAHUD, F.; RAMALHO, L. N. Z.; RAMALHO, F. S.; HADDAD, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. **Int. J. Exp. Path.** v. 90, n. 2, p. 166-173, 2009.

CHANG, B. Y.; PEAVY, T. R.; WARDRIP N. J. E HEDRICK, J. L. The *Xenopus laevis* cortical granule lectin cDNA cloning, developmental expression, and identification of the eglectin family of lectins **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 137 p. 115-129, 2004.

CHANG, W.W.; YU, C.Y.; LIN, T.W.; WANG, P.H.; TSAI, Y.C. Soyasaponin I decreases the expression of α 2,3-linked sialic acid on the cell surface and suppresses the metastatic potential of B16F10 melanoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v.341, p.614-619, 2006.

CHOUQUET, A; PAIDASSI, H.; LING, W.L.; FRACHET, P.; HOUEN, G. X-Ray Structure of the Human Calreticulin Globular Domain Reveals a Peptide-Binding Area and Suggests a Multi-Molecular Mechanism. **PLoS ONE** v.6 n.3, p. 17886, 2011.

CLARK, R.A.F. Wound repair: Overview and general considerations. In: **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair** (2nd ed.), edited by Clark, R. A. F. New York: Plenum, p. 3-50, 1996.

COELHO, C.O.C; CARRAZONI, P.G; MONTEIRO, V.L.C; MELO, F.A.D.; MOTA, A.; FILHO, F.T. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. **Acta Cir Bras**; v. 17, n. 1, p.11-13, 2001.

COHEN, E.; Recognition proteins, receptors and probes: invertebrates, in: **Progress in Clinical and Biological Research**, Ed. E. Cohen. A. R. Liss Inc., New York, v. 157, p. 207, 1984.

COOK-MILLS, J.M.; DEEM, T.L. Active participation of endothelial cells in inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 487, 2005.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, Paris, v.72, p.359-371, 2005.

CRAIG A. D. Pain mechanisms: Labeled lines versus convergence in central processing. **Annu. Rev. Neurosci.**, Phoenix, v.26, p.1-30, 2003.

CROCKER, P.R.; CLARK, E.A.; FILBIN, M.; GORDON, S.; JONES, Y; KEHRL, J. H.; KELM, S.; LE, DOUARIN, N.; POWELL, L.; RODER, J.; SCHNAAR, R.L.; SGROI, D.C.; STAMENKOVIC, K.; SCHAUER, R.; SCHACHNER, M.; VAN DEN

CROCKER, P.R. **Curr. Opin. Struct. Biol.** v. 12, p. 609–615, 2002.

CRONSTEIN, B.N.; WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v. 136, n. 2, p. 142, 1993.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Neoplasia. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L.(eds.). **Pathologic basis of disease**. 6 ed., Philadelphia: Saunders, 2000.

DA SILVA M. R. **Achatina fulica e sua utilização zoterápica através de dietas acrescidas de própolis**. 2009.Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, PIRASSUNUNGA, 2009.

DANGUY, A.; CAMBY, I; KISS, R. Galectins and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1572, n.2-3, p. 285-293, 2002.

DAVIS, K.D.; MEYER, R.A.; COHEN, R.H.; CAMPBELL, J.N. Mechanically-insensitive nociceptors in the primate. **Soc. Neurosc. Abst.**, v. 15, p. 440, 1989.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1b. **Crit Care Med**, v. 33, p. 460, 2005.

DODD, R. B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, v. 11, n. 5, p. 71-79, 2001.

DOUBELL, T. P.; MANNION, R. J.; WOOLF, C. J. The dorsal horn: state-dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain. **In: Churchill Livingstone. Textbook of pain**. London: P.D. Wall; R. Melzack, p. 165-181, 1999.

DRICKAMER, K. C-type lectin-like domains. **Curr Opin Struct Biol.**, v. 9, p. 585–590, 1999.

DRICKAMER, K. A genomics resource for animal lectins. **London**, 2006. Disponível em <<http://www.imperial.ac.uk/research/animallelectins/>>. Acessado em: 22 de dezembro de 2014.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem**, v.28, p.350-356, 1956.

DVORAK, A.M; FENG, D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endotelial cell permeability organelle. **J Histochem Cytochem** v. 49, p.419, 2001.

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

EHARA, T.; KITAJIMA, S.; KANZAWA, N.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. **FEBS Letters**, v.531, p. 509-512, 2002.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **J Invest Dermatol.**, v.127, p. 514-21, 2007.

ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. **Int J Biochem Cell Biol**, v.43, n.5, p.705-712, 2011.

ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. **Basic Science: surgery**. v. 26, n.7, p. 31-37, 2007.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J.S.: The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. **Mech Dev**, v. 120, p. 117, 2003.

FERREIRA, S.H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs**, v. 46, n. 1, p. 1, 1993.

FISCHER, L.G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; CECHINEL, V.F.; SOUZA, M.M. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.32, p.235-239, 2008.

FINNEY, D.. Probit Analysis. **University press**, Cambridge, UK , v.18, p. 37-77, 1971.

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.**, v.42, p.275-280, 2003.

FRENCHA, A. T.; BETHUNEA, J.A.; KNIGHTA, P. A.; MCNEILLYB, T. N.; WATTEGEDER. A.B.; RHINDA, S.; MILLERA, H. R.P.; PEMBERTONA, A. D. The expression of intelectin in sheep goblet cells and upregulation by interleukin-4 **Veterinary Immunology and Immunopathology** v.120, p. 41-46, 2007.

- FUCHINO, H. O.; WATANABE, Y.; TORU TAMIYA, C.; MATSUMOTO, J.J.; TSUCHIYA, T. Bacterial action of a glycoprotein from body surface mucus of giant african snail. **Camp. Biochem. Physiol.**, v. 101, n. 3, p. 607-613, 1992.
- FUJITA, T.; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y. The lectin complement pathway—its role in innate immunity Amino Acids evolution, **Immunological Reviews**, v. 198, p. 185–202, 2004.
- FURIE, B.; FURIE, C. Mechanisms of thrombus formation. **N Engl J Med.**, v. 359, n. 9, p. 938-49, 2008.
- GABIUS, H. J. Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code, **Naturwissenschaften**, v. 87, p. 108-121, 2000.
- GABOR, F.; BOGNER, E.; WEISSENBOECK, A.; WIRTH, M; The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.459-480, 2004.
- GALILU, U. Interaction of natural anti-Gal antibody with alpha galactosyl epitopes; a major obstacle for xenotransplantation in humans. **Immunology Today**, v.14, p.480-482, 1993.
- GILMAN, T. H. Comparing healing rates across studies is the vision, but first, a correct equation please. **Ostomy Wound Manage.** v. 41, n. 1, p. 6-7, 1994.
- GOLDSTEIN, I. J.; HAMMARSTROM, S.; SUNDBLAD, G.; Precipitation and carbohydrate binding specificity studies on wheat germ agglutinin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 405 p. 53-61, 1975.
- GOLDSTEIN, I. J.; PORETZ, R.D. Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate binding specificity of lectins. *In*: LIENER, I.E; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, **Eds Academic Press Inc.**, New York 1986. p. 35-244.
- GOSS, R.J. Regeneration versus repair. *In*: COHEN, I.K.; DIEGELMAN, R.F.; LINDBLAD, W.J. (eds): Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects. Philadelphia: **WB Saunders**, 1992.
- GROEBER, F.; HOLEITER, M.; HAMPEL, M.; HINDERER, S.; SCHENKE-LAYLAND, K. Skin tissue engineering- *in vivo* and *in vitro* application. **Advanced Drug Delivery**, 2011 [IN PRESS].
- GRUBB, B.D. Peripheral and central mechanism of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v.81, n.1, p.8-11, 1998.
- GUPTA, G.S. Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications. **Springer Vienna**, 2012.
- HAKOMORI S. Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 99, n.16, p.10231–10233, 2002.

HALL, L.W.; CLARKE, K.W. **Veterinary anaesthesia**. London: Ballière Tindall, 410 p., 1991.

HANDWERKER, H.O.; KILO, S.; REEH, P.W. Afferent C-fibres from rat hairy skin not driven by natural stimulation. **Soc. Neurosc. Abst.** v. 15, p. 1265, 1989.

HAYASHI, C., SOARES, C.M., FURUYA, W.M., GONÇALVES, G.S. Teores de cálcio em rações para o escargot francês *Helix aspersa maxima* em fase de crescimento. **Maringá**, v. 27, n. 1, p. 57-61. 2005.

HEAPY, C.G.; JAMIESON, A.; RUSSELL, N.J.W. Afferent C-fiber and A-delta activity in models of inflammation. **Br. J. Pharmacol.** v. 90, p. 164, 1987.

HO, M.S.; TSAI, P.I.; CHIEN, C.T. F-box proteins: the key to protein degradation. **J Biomed Sci.**, v. 13, p. 181–191, 2006.

HOLANDA, M.L.; MELO, V.M.M.; SILVA, L.M.C.M.; AMORIM, R.C.N.; PEREIRA, M.G.; BENEVIDES, N.M.B. Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, v.38, n.12, p.1769-1773, 2005.

HONDA, S.; KASHIWAGI, M.; MIYAMOTO, K. Multiplicity, structures, and endocrine and exocrine natures of eel fucose-binding lectins. **J Biol Chem**, v. 275, p. 33151–33157, 2000.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B; HOLE, K. Formalin test in mice: a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Meth.** v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; ROLE, K., The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, n. 1, p.103-114, 1987.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat. Rew. Neurosci.**, London, v.2, p.83-91, 2001.

HUNTER J: A Treatise of blood, Inflammation, and Gunshot Wounds. **London, J. Nicoli**, 1794.

IASP. **IASP patrocina Ano Global Contra a Dor Visceral**. 2012. Disponível em: <<www.iasp-pain.org/GlobalYear/VisceralPain. Acesso em: 02 fev. 2015.

IGUCHI, S.M.M; AIKAWA, T; MATSUMOTO, J.J. Antibacterial activity of snail mucus mucin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 72, n.3, p. 571-574, 1982.

IGUCHI, S.M.M.; MOMOI, T.; EGAWA, K An N-acetylneuraminic acid-especific lectin from the body surface mucus of african giant snail. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 81b, n. 4, p. 897-900, 1985.

INDRA, D.; GANESH, S.; RAMALINGAM, K.; ASOKAN, C.; JAYAKUMAR, R. Immunological significance of metal induced conformational changes in the mitogenic AchatininH binding to carbohydrate ligands. **Comp. Biochem. Physiol.** v.127, p. 177–183, 2000.

INOUE, S.; LIN, S.; CHANG, T.; WU, S.; YAO, C.; CHU, T.; TROY, F.; INOUE, Y.; Identification of free deaminated sialic acid (2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic Acid) in human red blood cells and its elevated expression. In fetal cord red blood cells and ovarian cancer cells. **The journal of biological chemistry**. v. 273, n. 42, p. 27199 – 27204, 1998.

INOUE, S.; KITAJIMA, K. KDN (Deaminated neuraminic acid): Dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid Family. **Glycoconj J**, v.23, p. 277 – 290, 2006.

ITO, S.; SHIMIZU, M.; NAGATSUK, M.; HONDA, M.; TSUCHIYA, T.; KANZAWA, N. High molecular weight lectin isolated from mucus of the giant African snail *Achatina fulica*. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 75, n.1, p. 20-25, 2011.

JOHNSTON, B.; BUTCHER, E.C. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggerind and migration. **Semin Immunol**, v. 14, n. 83, 2002.

JOHNSON, K.O. The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. **Curr Opin Neurobiol**, v. 11, p. 455, 2001.

JONAKOVA, V.; KRAUS, M.; VESELSKY, L.; CECHOVA, D. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. **J. Reprod. Fertil**. v. 114, p. 25-34, 1998.

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

KAWASAKI, N. Collectins and Their Roles in Host Defense. 1998.
http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LE_E.html acesso em 10/11/2014

KILPATRICK, D.C. Handbook of animal lectins, properties and biomedical applications. **Eddinburg: British library**, 2000. 468p.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica**, v. 1572, p. 187-197, 2002.

KIM, Y.J., VARKI, A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. **Glycoconj J**. v.14, n.5, p.569–576, 1997.

KIPREOS, E.T.; PAGANO, M. The F-box protein family. **Genome Biol.**, v. 1, p. 3002.1–3002.7, 2000.

KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Sci. Int**. v. 15, n.1-3, p. 93-8, 2010.

KORNFELD, S.; SLY, W.S.; Cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: Disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. *In*: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, 2001.

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

KUBOTA, Y.; WATANABE, Y.; OTSUKA, H.; TSUCHIYA, T.T.T.; MATSUMOTO, J.J. Purification and characterization of a antibacterial factor from snail mucus. **Camp. Biochem. Phviol.**, v. 82, n. 2, p. 345-348, 1985.

KUMAR, M. S.; SRIPRIYA, R.; RAGHAVAN, H. V.; SEHGAL, P. K. Wound healing potential of *Cassia fistula* on infected albino rat model. **Journal of Surgical Research.**, v. 131, p. 283-289, 2006.

KUPPER, T.S.; FUHLBRIGGER, C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Net Rev Immunol**, v.4, p.211, 2004.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAFFLY, E.; LACROIX, M.; MARTIN, L.; VASSAL-STERMANN, E.; THIELENS, N.M.; GABORIAUD, C. Human ficolin-2 recognition versatility extended: An update on the binding of ficolin-2 to sulfated/phosphated carbohydrates. **FEBS Letters** v. 588, p. 4694–4700, 2014.

LAMPUGNANI, M.G.; DEJANA, E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. **Curr Opin Cell Biol**, v.9, p.674, 1997.

LAU, K.S.; DENNIS, J.W. N-Glycans in cancer progression. **Glycobiology**, v.18, n.10, p.750–760, 2008.

LAWRENCE, W.T. Wound healing biology and its application to wound management. In: O'Leary, J. P.; Capota, L. R., editors. **Physiologic Basis of Surgery**. 2nd edition. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins p. 118-35, 1996.

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

LEE, J.K.; BUCKHAULTS, P.; WILKES, C. Cloning and expression of a *Xenopus laevis* oocyte lectin and characterization of its mRNA levels during early development. **Glycobiology**, v. 7, p. 367–372, 1997.

LEE, Y.; LEE, C. H.; OH, U. Painful channels in sensory neurons. **Mol Cells**, v. 20, n. 3, p. 315-24, 2005.

LENTSCH, A.B.; WARD, P.A. Regulation of inflammatory vascular damage. **J Pathol.** v. 190, n. 3, 2000.

LESCAR, J; SANCHEZ, J.F.; AUDFRAY, A.; COLL, J.L.; BRETON, C.; MITCHELL, E.P.; IMBERTY, A.; Structural basis for recognition of breast and colon cancer epitopes Tn antigen and Forssman disaccharide by Helix pomatia lectin. **Glycobiology**, v. 17, n. 10, p. 1077–1083, 2007.

- LINCOLN, B.J.; SIMPSON, T.R.E.; KEDDIE, J.L. Water vapour sorption by the pedal mucus trail of a land snail. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, v. 33, p. 251-258, 2004.
- LOPES, F.C.; CAVADA, B.S.; PINTO, V.P.T.; SAMPAIO, A.H.; GOMES, J.C. Differential Effect of Plant Lectins on Mast Cells of Different Origins. *Bras. J. Med. Biol. Res.*, v. 38, n. 6, p. 935-941, 2005.
- LORENZI A.T. **Estudo colorimétrico e espectroscópico do muco de caracóis *Achatina sp* alimentados com rações acrescidas de plantas medicinais.** 2006 Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, PIRASSUNUNGA. 2006.
- LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1572 (2-3) p. 198-208, 2002.
- LOWE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. Auckland: The Invasive Species Specialist Group, 12 p., 2006.
- LYNN, B. Capsaicin: actions on C fibre afferents that may be involved in itch. *Skin Pharmacol.*v. 5, n. 1, p. 9-13, 1992.
- MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; SILVA, M.B.R.; COELHO, L.C.B.B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology A*. v.146, p. 486-498, 2007.
- MARTIN, P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science*. v. 276, n. 5309. p. 75-81, 1997.
- MARTINS, M.F.; CAETANO, F.A.M.; SÍRIO, O.J. Avaliação do reparo de lesões de pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina fulica*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* , São Paulo, v. 40, p.213-218, 2003.
- McEVER, R.P. Leukocyte interactions mediated by selectins. *Thromb. Haemost.*, v. 66, n. 1, p. 80-87, 1991.
- McGREAL, E. P.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol.*, v. 41, p. 1109-1121, 2004.
- McMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. Novel class of nociceptors: beyond Sherrington. *Trends Neurosci.*, v. 13, p. 199, 1990.
- McNAMARA, C.R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K.L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N.J.; CHONG, J.A.; JULIUS, D.; MORAN, M.M.; FANGER, C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.104, n.33, 2007.

- MANDAL, C; MANDAL, C. Sialic acid binding lectins. Reviews. **Experientia. Birkhauser Verlag.** v. 46, p. 433 – 441, 1990.
- MELZACK, R.; LOESER, J. D. Pain: an overview. **Pain**, Seattle, v. 353, p.1607-1609, 1999.
- MEHTA, D; MALIK, A.B. Signaling mechanisms regulating endotelial permeability. **Physiol Ver** v.86, p.279, 2006.
- MELO, A.A. **Isolamento e caracterização parcial de uma lectina do zoantídeo marinho *Palythoa caribbaeorum* (duchassaing & michelotti, 1860).** 2011. Monografia – (Graduação em Engenharia de Pesca), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 2011. 39p
- MENSE, S. Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia. **Am J Med.** v. 14, n. 75, p. 4-14, 1983.
- MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica.** 2. ed. São Paulo: Michalany, 1991. 277 p.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog.Neuobiol.**, v. 57, p. 1-164,1999.
- MIMEAULT, M. Stem cells: a revolution in therapeutics – recente advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and câncer therapies. **Clin Pharmacol Ther** 82: 252, 2007
- MITRA, D.; SARKAR, M.; ALLEN, A.K. Further characterization of the cold agglutinin from the snail *Aehatinafulica*. **Biochem. J.** v.242, p. 331-338, 1987.
- MITRA, D.; SARKAR, M.; ALLEN, A.K. Purification and characterization of an agglutinin from mucus of snail *Achatina fulica*. **Biochimie**, v. 70, n.12, p.1821-1829, 1988.
- MITCHELL, S.W. Researches upon the venom of the rattlesnake. **Smithson. Contrib. Knowl.** p. 89-90, 1860.
- MITCHELL, S.W.; REICHERT, E.T. Researches upon the venoms of poisonous serpents. **Smithson. Contrib. Knowl.**, v. 155,1886.
- MIZUSHIMA, T.; HIRAO, T.; YOSHIDA, Y.; LEE, S.J.; CHIBA, T.; IWAI, K.; YAMAGUCHI, Y.; KATO, K.; TSUKIHARA, T.; TANAKA, K. Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, 11, 365-370. 2004.
- MOLEMA, G.; MEIJER, D.K.F. Targeting of drugs to various blood cell types using (neo)glycoproteins, antibodies and other protein carriers. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v.14, n.1, p.25-50, 1994.
- MOREIRA, R.A.; PERRONE, J.C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiol.**, v.59, p.783–787, 1977.

MOREIRA, R.A.; AINOZ, I.L.; OLIVEIRA, J.T.A; CAVADA, B.S. Plant Lectins Chemical and Biological Aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n.2 p. 211-218, 1991.

MOURA, R. M. **Purificação, caracterização e propriedades biológicas de lectinas do equinodermo *Holothuria grisea***. 2010. Tese de doutorado em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, 2010.

MURPHY, G.F. The secret of “NIN”, a novel neural immunological network potentially integral to immunologic functions in human skin. *In*: NICKOLOFF, B.J. (ed): **Dermal Immune System**, Boca Raton, FL, **CRC, Press**, 1993, p 227.

MURPHY, K.E.; HALL, C.L.; MCCUE, S.W.; SEAN MCELWAIN, D. L. A two-compartment mechanochemical model of the roles of transforming growth factor β and tissue tension in dermal wound healing. **Journal of Theoretical Biology**, v. 272, p. 145-159, 2011.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; LIMA E SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M., ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C.; Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larva de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n.2, p. 145-150, 2008.

NAGANO, C.S.; MORENO, F.B.M.B.; BLOCH JUNIOR, C.; PRATES, M.V.; CALVETE, J.J.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W.R.L.; TAVARES, T.D.; NASCIMENTO, K.S.; GRANGEIRO, T.B.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H. Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Protein and Peptide Letters**, p. 159-165. 2002.

NARIMATSU, H; SAWAKI, H; KUNO, A; KAJI, H; ITO, H; IKEHARA, Y. A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics. **FEBS J**. v.277, n.1, p. 95–105, 2009.

NETO, L.G.N. **Utilização da lectina isolada de sementes de *Bauhinia variegata* e sua isoforma recombinante no tratamento de lesões cutâneas induzidas em camundongos**. 2011 Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Ceará, 2011.

NIV, D.; KREITLER, S. Pain and Quality of life. **Pain Practice**, v. 1, p. 150-161, 2001.

NODDER, S.; MARTIN, P. Wound healing in embryos: a review. **Anat Embryol.**, v. 195, p. 215-228, 1997.

OBARA, K.; OTSUKA-FUCHINO, H.; SATTAYASAT, N.; NONOMURA, Y.; TSUCHYA, T. Molecular cloning of the antibacterial protein of the giant African snail, *Achatina fulica* Ferussac. **Eur. J. Biochem.**, v. 209, p. 1-6, 1992.

OBARA, K.; ISHIHARA, M.; FUJITA, M.; KANATANI, Y.; HATTORI, H.; MATSUI, T.; TAKASE, B.; OZEKI, Y.; NAKAMURA, S.; ISHIZUKA, T.; TOMINAGA, S.; HIROI, S.; KAWAI, T.; MAEHARA, T. Acceleration of wound healing in healing-impaired db/db mice with a photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2. **Wound Rep Reg.**, v. 13, p. 390-397, 2005.

OGAWA, T.; WATANABE, M.; NAGANUMA, T.; MURAMOTO, K. Diversified Carbohydrate-Binding Lectins from Marine Resources. **Journal of Amino Acids**. v. 2011, p. 1-20, 2011.

OLSEN D., LUCHETEL D.L. Secretion of mucus granules and others membrane bond strutures: a look beyond exocytosis. **Int. Vet. Cytol.**, v. 183, p. 95-141, 1998.

OLSON, L.J.; CASTONGUAY, A.C; LASANAJAK, Y.; PETERSON, F.C.; CUMMINGS, R.D.; SMITH, D.F.; DAHMS, N.M. Identification of a fourth mannose-6-phosphate binding site in the cation – independente mannose 6- phosphate receptor. **Glycobiology**, v. 1, p. 16, 2015.

OTT, H.C. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. **Nat Med**, v.14, p.213, 2008.

OUTENREATH, R.L.; ROBERSON, M.M.; BARONDES, S.H. Endogenous lectin secretion into the extracellular matrix of early embryos of *Xenopus laevis*. **Dev Biol.**, v. 125, p. 187–194, 1988.

PACHECO, P.; MARTINS, M.F.M; BATTEMARQUE, V.; RODRIGUEZ, P.H.M.; GHION, E.; SPERS A. Diferentes formas de cálcio na dieta do escargot gigante africano (*Achatina fulica*) e seu efeito no crescimento e rendimento da carcaça. *Higiene Alimentar*, v. 12, v.55, p.43-46, 1998.

PAIVA, M.G. **Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em cicatrização experimental**. 56f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, D.N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutics intervention. **Br. J. Pharmacol.**, v. 126, n. 3, p. 537-550, 1999.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American Journal of Surgery**, v. 187, n. 5, p. 11S-16S, 2004.

PETRI, B; BIXEL, M.G. Molecular events during leukocyte diapedesis. **FEBS J** v. 273, p. 4399, 2006.

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

POWELL, L.D.; VARKI, A. I-type lectins. **J. Biol. Chem.**, v. 270 p. 14243–14246, 1995.

PRATA, M.; HADDAD, C.; GOLDENBERG, S. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 3, n. 2, p. 43-48, 1998.

RAJA, S .N.; MEYER, R. A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J. N. Peripheral neural mechanisms of nociception. *In: WALL, R. Texbook of pain*. Churchill Livingstone, London: p 11-57, 1999.

REIBMAN, J.; NOVATO, L.A.; CAMPOS, A.M.F.T. Transforming growth factor beta 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 5, n.3, p. 88- 95, 2010.

RHETT, J. M.; GHATNEKAR, G. S.; PALATINUS, J. A.O.; QUINN, M.; YOST, M.J.; GOURDIE, R.G. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. **Trends in Biotechnology.**, v. 26, p. 173-180, 2008.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol.** v. 3, n. 387, p. 111-118, 2000.

RIEDEL, W; NEECK, G. Nociception, pain and antinociception: current concepts. **Rheumatol.**, v. 60, n. 6, p. 404-15, 2001.

ROBBINS, S.S.; CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. Patologia: bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 8a ed., 2010.

ROCHA, A. P.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.; DE CARVALHO, L. R.; DE BARROS G. A.; GARCIA, J. B.; SAKATA, R. K. Pain: current aspects on peripheral and central sensitization. **Rev Bras Anesthesiol.** v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

RODRIGUES, J.S.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; COELHO, L.C.B.B.; COUVREUR, P.; PONCHEL, G.; GREF, R. Novel core (polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. **Journal of Controlled Release** v.92, p.103-112, 2003.

SAITO, T.; HATADA, M.; IWANAGA, S. A newly identified horseshoe crab lectin with binding specificity to O-antigen of bacterial lipopolysaccharides. **J Biol Chem.**, v. 272, p. 30703–30708, 1997.

SANCHEZ, J.; LESCAR, J.; CHAZALET, V.; AUDFRAY, A.; GAGNON, J.; ALVAREZ, R.; BRETON, C.; IMBERTY, A.; MITCHELL, E. Biochemical and Structural Analysis of Helix pomatia Agglutinin A hexameric lectin with a novel fold. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 29, p. 20171-20180, 2006.

SANZ, L.; CALVETE, J.J.; MANN, K.; GABIUS, H.J. Isolation and biochemical characterization of heparinbinding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. **Mol. Reprod.** v. 35, p. 37-43, 1993.

SALES, M.P.; GERHARDT, I.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; XAVIER-FILHO, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids?. **Plant Physiology**, v. 124 p. 515-522, 2000.

SALLUSTO, F.; MACKAY, C.R. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. **Cur Opin Immunolol**, v. 16, n. 724, 2004.

SARKAR, M.; BACHHAWAT, B.K.; MANDAL, C. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 233, p. 286-289, 1984.

SCHAG, J.D.; BERGERON, J.J.M.; LI, Y.; BORISOVA, S.; HAHN, M.; THOMAS, D.Y.; CYGLER, M. The Structure of Calnexin, an ER Chaperone Involved in Quality Control of Protein Folding. **Molecular Cell**, v. 8, p. 633–644, 2001.

SCHREMEL, S.; SZEIMIES, R.M.; PRANTL, L.; LANDTHALER, M.; BABILAS, P. Wound Healing in the 21st Century. **J Am Acad Dermatol.**, v. 63, n. 5, p. 866-81, 2010.

SEARS, P.; WONG, C.H. Carbohydrate Mimetics: A New Strategy for Tackling the Problem of Carbohydrate-Mediated Biological Recognition. **Angew. Chem., Int. Ed.Engl.** v.38, n.16, p.2300-2324, 1999.

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. Initiation of the inflammatory response and its prevention. *In*: BONTA, I.L.; BRAY, M.A.; PARNHAM, M.J. Handbook of Inflammation. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p. 27-47, 1985.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v.14, p.53-62, 2004.

SHERRATT, J. A.; DALLON, J. C. Theoretical models of wound healing: past successes and future challenges. **C. R. Biologies.**, v. 325, p. 557-564, 2002.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v.38, p. 347-352, 1989.

SIMKISS, K.; WILBUR, K.M. The molluscan epidermis and its secretions. **Symp. Zool. Soc. Lond**, v. 39, p. 35-75, 1977.

SKINGSLEY, D.R.; WHITE, A.J.; WESTON, A. Analysis of pulmonate mucus by infrared spectroscopy. **Journal Molluscan Studies**, v. 66, p. 363-371, 2000.

SÍRIO O.J. **Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta à base de confrei.** 2005. Dissertação de Mestrado Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga.

SOLIS, D.; ROMERO, A.; JIMENEZ, M.; DIAZ-MAURINO, T.; CALVETE, J.J. **FEBS Letters**, v. 431, p. 273-278, 1998.

STRUTHERS, M.; ROSAIR, G.; BUCKMAN, J.; VINEY, C. The physical and chemical microstructure of the *Achatina fulica* epiphragm. **Journal of molluscan Studies**, v. 68, p. 165-171, 2002.

SYRIÁTOWICZ J.P.; HU, D.; WALKER J.S.; TRACEY, D.J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. **Neurosci.**, Sydney, v.94, n.2, p.587-594, 1999.

TEIXEIRA, D.I.; MELO, L.M.; GADELHA, C.A.; CUNHA, R.M. Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. **Genet. Mol.** v. 5, p. 79-87, 2006.

TEMPONE, A.G. Cutaneous secretion from the giant African snail, *Achatina fulica*, as a source of Antileishmanial compounds. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 73-77, 2007.

TELES, H.M.S.; FONTES, L.R. Implicações da introdução e dispersão de *Achatina fulica* Bowdich 1822 no Brasil. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, v. 12 p. 3-5, 2002.

TELLER, P.; WHITE, T. K. The Physiology of Wound Healing: Injury Through Maturation. **Surg. Clin. N. Am.**, v. 89, n.3, p. 599-610, 2009.

TICHA, M.; KRAUS, M.; CECHOVA, D.; JONAKOVA, V. Saccharide-binding properties of boar AQN spermadhesins and DQH sperm surface protein. **Folia Biol.** v. 44, p. 15-21, 1998.

TIENTHAI, P.; SUZUKI, K.; PERTOFT, H.; KJELLEN, L. Production of glycosaminoglycans by the porcine oviduct in relation to sperm storage. **Reprod. Domest. Anim.** v. 35, p. 167-170, 2000.

THIENGO, S.C.; FARACO, F.A.; SALGADO, N.C.; COWIE, R.H.; FERNANDEZ, M.A. Rapid spread of an invasive snail in South America: the giant African snail, *Achatina fulica*, in Brazil. **Biological Invasions** v.4, p. 1-10, 2007.

TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: BESSON, M. J.; DECKESON, A. The pharmacology of pain., Berlin: **Springer-Verlag**, p. 21-41, 1997.

TOGNINI, P. G.; FOSTER, R. S.; MCGRAW, P. HEILMAN, D.; BIHRLE, R.; ROWLAND, R. G.; WAHLE, G. R.; EINHORN, L. H.; DONOHUE, J. P. Combined post-chemotherapy retroperitoneal lymph node dissection and resection of chest tumor under the same anesthetic is appropriate based on morbidity and tumor pathology. **J Urol.**, v. 159, n. 6, p. 1833-5, 1998. Erratum in: **J Urol.**, v. 160, n. 4, p. 1444, 1998.

TOMIYAMA, K. Courtship behaviour of the Giant African snail, *Achatina fulica* (Ferussac) (Stylommatophora; Achatinidae) in the field. **Journal of Molluscan Studies**, v. 60, p. 47-54, 1994.

TOMIYAMA, K.; MIYASHITA, K. Variation of egg clutches in the Giant African snail, *Achatina fulica* (Ferussac) (Stylomatophpra; Achatinidae). **Venus**, v.51, n.4, p.293-301, 1992.

TSUTAUI, S.; OKAMOTO, M.; ONO, M.; SUETAKE, H.; KIKUCHI, K.; NAKAMURA, O.; SUZUKI, Y.; WATANABE, T. A new type of lectin discovered in a fish, flathead (*Platycephalus indicus*), suggests an alternative functional role for mammalian plasma kallikrein. **Glycobiology**, v.21, n. 12, p.1580-1587, 2011.

VALBUENA, G; WALKER, D.H. Endothelium as a target of infections. **Annu Rev Pathol Mech Dis** v.1, p.151, 2006.

VASCONCELLOS, M. C.; PILE, E. Ocorrência de *Achatina fulica* no Vale do Paraíba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n.6, p. 582-84, 2001.

VASTA G.; AHMED H.. Animal lectins: A functional View. **New York: CRC Press**, 2008. 596 p.

VARKI, A. Essentials of Glycobiology The “I-type” Lectins and the Siglecs Lecture 23, 2004 Disponível em: <http://grtc.ucsd.edu/lecture23.pdf> Acesso em 04 nov 2014.

VEIGA, L.F.; VITAL, N. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: (eds.), **Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil.**, p. 111-112, 2002.

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

VIJAYAN, M. ; CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 707–714, 1999.

VIMR, E.R.; KALIVODA, K.A.; DESZO, E.L.; STEENBERGEN, S.M. Diversity of microbial sialic acid metabolism. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.68, p.132, 2004.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; JOHNSTON, P.R.; VENABLE, A.L.; MCKENZIE, K.K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat, **Fed. Proc.**, v. 46, p. 118-126, 1987.

WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews Bethesda**, v. 52, n. 3, p. 349- 374, 2000.

WATKINS, W.M. A half century of blood-group antigen research: some personal recollections. **Trends Glycosci. Glycotechnol.** v. 11, p. 391-411, 1999.

WEIS, W.I.; DRICKAMER, K. Structural basis of recognition lectin-carbohydrate. **Annual Review of Biochemistry.**, v.65 p. 441-473, 1996.

WEIS, W.I.; TAYLOR, M.E.; DRICKAMER, K. The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunol.**, v. 163, p. 19–34, 1998.

WEISSMAN, G (ed): Inflammation: Historical Perspectives. New York, **Raven Press**, 1992.

WERNER, S; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Ver** v. 83, p. 835, 2003

WILD, T.; RAHBARNIA, A.; KELLNER, M.; SOBOTKA, L.; EBERLEIN, T. Basics in nutrition and wound healing. **Nutrition.**, v. 26, p. 862-866, 2010.

WILGUS, T. A. Immune cells in the healing skin wound: influential players at each stage of repair. **Pharmacological research**. v. 58, n. 2, p. 112-116, 2008.

WILSON, J. C., VON ITZSTEIN M. Recent strategies in the search for new anti-influenza therapies. **Currents Drugs Targets**, Oak Park, v. 4, p. 389, 2003.

WINSTON, J.T.; KOEPP, D.M.; ZHU, C. A family of mammalian F-box proteins. **Curr Biol.**, v. 9, p. 1180–1182, 1999.

VALLE, W.S. *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. New York: **McGraw Hill**. p. 3469–3482, 2001.

YABU, M; KOREKANE, H.; HATAMO, K; KANEDA, Y; NONOMURA, N; SATO, C; KITAJIMA, K; MIYAMOTO, Y. Occurrence of free deaminoneuraminic acid (KDN)-containing complex-type N-glycans in human prostate cancers. **Glycobiology**. v. 23 n. 6, pp. 634-642, 2013.

YEATON, R. W. Invertebrate lectins. I. Occurrence. **Dev. comp: Immun.** v. 5, p. 391-402, 1981.

YEATON, R. V. Invertebrate lectins. II. Diversity of specificity, biological synthesis and function in recognition. **Dev. comp. Immun.** v. 5, p. 535-545, 1981.

YOSHIDA, Y.; TANAKA, K. Lectin-like ERAD players in ER and cytosol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1800, p.172-180, 2010.

ZACHARIUS, R.M.; ZELL, T.E.; MORRISON, J.H.; WOODLOCK, J.J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Anal Biochem**, v.30, p.148–152, 1969.

ZAKARIA, Z.A.; GOPALAN, H.K.; ZAINAL, H.; MOHD POJAN, N.H.; MORSID, N.A.; ARIS, A.; Antinociceptive, antiinflammatory and antipyretic effects of *Solanum nigrum* Chloroform extract in animal models. **Yakugaku Zasshi**, v.126, p.1171-1178, 2006.

ZELENSKY, A.N.; GREASY, J.E. The C-type lectin-like superfamily. **FEBS Journal**, v.272, p.6179-61217, 2005.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.