



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FLÁVIO DA SILVEIRA BITENCOURT

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DA
LECTINA ISOLADA DA ALGA MARINHA VERMELHA

***Hypnea cervicornis* (J. Agardh)**

FORTALEZA – CE
2007

FLÁVIO DA SILVEIRA BITENCOURT

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DA
LECTINA ISOLADA DA ALGA MARINHA VERMELHA**

Hypnea cervicornis (J. Agardh)

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.

Orientador (a):

Prof^ª. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

**Fortaleza
2007**

B536e Bitencourt, Flávio da Silveira

Estudo da Atividade Antiinflamatória e Antinociceptiva da Lectina Isolada da Alga Marinha Vermelha *Hypnea cervicornis* (J. Agardh) / Flávio da Silveira Bitencourt; Orientador: Nylane Maria Nunes de Alencar. – Fortaleza, 2007.

140f.: il.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, 2007.

1. Lectinas de plantas 2. *Hypnea cervicornis* 3. Antiinflamatórios 4. Analgésicos 5. Óxido nítrico I. Alencar, Nylane Maria Nunes de (Orient.) II. Título.

CDD 615.783

FLÁVIO DA SILVEIRA BITENCOURT

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DA
LECTINA ISOLADA DA ALGA MARINHA VERMELHA**

***Hypnea cervicornis* (J. Agardh)**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 12 / 07 / 2007

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará – UECE

**Aos meus pais Maria da Silveira Bitencourt
e Ciro Bitencourt (*in memoriam*) por fazerem
da educação uma prioridade e
por sempre me ensinarem
a enfrentar as adversidades e amar a vida.**

**À Andréa por estar sempre
ao meu lado, me apoiando
mesmo nos momentos
mais difíceis, e sempre com
carinho e compreensão.**

AGRADECIMENTOS

À Deus por todos os momentos maravilhosos que tenho tido em minha vida, todos os momentos felizes e porque não os tristes? Aprendi muito com eles, muitos valores guardei e muitas vitórias conquistei.

Aos meus irmãos, Ciro e Marcos, e em especial à minha irmã Ana Maria por sempre terem cuidado de mim e me ensinado muitas coisas na vida.

À profª Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar minha orientadora desde a iniciação científica, por me ajudar na minha formação científica, sempre com confiança, compreensão, dedicação, paciência e profissionalismo durante a realização desse trabalho, mas antes de tudo por ser uma grande amiga.

Ao profº Dr. Benildo Sousa Cavada pela contribuição na minha formação científica e pela confiança em mim depositada.

Ao profº Dr. Alexandre Holanda Sampaio pela disponibilidade de atenção e pela lectina fornecida.

À profº Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy pelo recente convívio e amizade, e pelas correções críticas e de grande valor ao artigo da HCA bem como a essa dissertação.

À profª Dra. Cléa Florenço de Sousa por ter aceitado gentilmente o convite de participar da banca e contribuir para a discussão desse trabalho.

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

À minha “prima”, grande companheira, amiga e conterrânea Jozi Godoy, que conheci logo no início do desenvolvimento desse trabalho mostrando sempre grande força de vontade e determinação ajudando em todos os experimentos, não importando a hora e o dia. Valeu gurial!

Ao Mário pela ajuda durante os experimentos, pela suas críticas sempre construtivas e pela grande amizade, porém com certeza duradoura e de grande valor.

À Ingrid minha “primeira chefe” e olhe que ela era uma IC. Uma grande amiga e uma das primeiras pessoas a me mostrar o fascínio da pesquisa e que me ensinou muita coisa dentro de um laboratório.

As meninas do laboratório e grandes amigas Priscila, Carla, Cinthia, Cibele e Taiana por terem me ajudado no desenvolvimento desse trabalho e por grandes momentos de aprendizado e companhia.

À Mirela, Cid, Michael, Rodney, Rafael, Márcia, Ítalo e Jonnathan pela amizade e companheirismo.

À Patrícia, técnica do laboratório de Bioquímica da Farmacologia e “promoter” de todos os eventos existentes no laboratório, uma pessoa maravilhosa, dedicada e responsável.

À Karol pela grande amizade, mesmo estando na França, esteve em contato comigo sempre com palavras de apoio e carinho.

Aos integrantes do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, principalmente aqueles responsáveis pelo brilhante trabalho árduo, mas gratificante, de isolar e purificar as lectinas dia-a-dia. Em especial a galera da pesca (Rafael, Átila, Felipe e Jonas) e a doutoranda Kyria.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, que se mostraram prestativos e atenciosos, sempre que precisei. *“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes” - Issac Newton.*

Ao Laboratório de Inflamação e Dor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Rose, Mônica, Chiquinho, Aura, Íris, Marta, Joana e Haroldo e a Vandinha (LAFICA).

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Meu Muito Obrigado!

**“Quem não compreende um olhar, tampouco compreenderá
uma longa explicação”**

Mário Quintana

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	13
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE FIGURAS.....	17
RESUMO.....	19
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Lectinas: Definição e Classificação.....	22
1.1.1. Efeitos biológicos de lectinas	24
1.2. Algas marinhas	27
1.2.1. Lectinas de algas marinhas: efeitos biológicos	27
1.2.2. Lectina de algas marinhas vermelhas: <i>Hypnea cervicornis</i>	28
1.3. Inflamação	29
1.3.1. Eventos vasculares	31
1.3.2. Eventos celulares.....	32
1.3.3. Mediadores da inflamação	37
1.3.3.1. Citocinas.....	38
1.3.3.2. Óxido Nítrico.....	40
1.4. Dor.....	42
1.4.1. Tipos de Dor.....	43
1.4.2. Mecanismo da Dor	44
1.5. Relevância e justificativa.....	48
2. OBJETIVOS	50
2.1. Geral.....	50
2.2. Específicos	50
3. MATERIAIS	53
3.1. Lectina	53
3.2. Animais experimentais.....	53
3.3. Drogas e reagentes	54
3.4. Equipamentos e materiais	55
4. MÉTODOS	58
4.1. Estudo da atividade antiinflamatória	58

4.1.1. Avaliação do efeito da HCA sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por agente quimiotático indireto (Cg) e direto (fMLP)	58
4.1.1.1. Avaliação da participação do sítio de ligação à mucina da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> sobre a migração de neutrófilos	59
4.1.1.2. Avaliação da atividade antiinflamatória da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> após desnaturação térmica	59
4.1.1.3. Avaliação do efeito da HCA sobre o rolamento e adesão dos leucócitos induzidos por Cg na microcirculação mesentérica.....	59
4.1.1.4. Estudo do envolvimento do óxido nítrico na atividade antiinflamatória da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i>	60
4.1.1.5. Avaliação do efeito da HCA sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α) no fluido peritoneal	62
4.1.2. Avaliação do efeito da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> sobre a quimiotaxia de neutrófilos <i>in vitro</i>	63
4.1.3. Avaliação do efeito da HCA sobre o edema de pata induzido por Carragenina e Dextrana.....	64
4.1.3.1. Participação do sítio de ligação da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> sobre o seu efeito anti-edematogênico.....	64
4.2. Estudo da atividade antinociceptiva.....	65
4.2.1. Contorção abdominal induzida por ácido acético	65
4.2.2. Teste da Formalina	65
4.2.3. Teste da Placa quente	66
4.2.4 Teste do rota rod.....	66
4.3. Avaliação de efeitos sistêmicos decorrentes do tratamento endovenoso com a lectina de <i>Hypnea cervicornis</i>	67
4.3.1. Toxicidade sub-crônica	67
4.3.2 Avaliação da pressão arterial após injeção de <i>Hypnea cervicornis</i>	68
4.4. Análise estatística	68
5. RESULTADOS	70
5.1. Estudo da atividade antiinflamatória	70
5.1.1. A lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> reduz de forma dose-dependente a migração de neutrófilos induzida por carragenina em ratos.....	70
5.1.2. A associação da HCA ao seu ligante específico (Mucina) bloqueia seu efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos	70
5.1.3. A desnaturação térmica da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> inibe sua atividade antiinflamatória no modelo de peritonite induzida por carragenina em ratos	72

5.1.4. Lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> apresenta atividade antiinflamatória de forma dose-dependente no modelo de peritonite induzida por fMLP em ratos	72
5.1.5. Lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> diminui o rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos	74
5.1.6. O tratamento com HCA aumenta os níveis sanguíneos de óxido nítrico em ratos	74
5.1.7. A atividade antiinflamatória da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> depende da produção de óxido nítrico: aminoguanidina e L-Nitro-Arginina revertem sua atividade.....	74
5.1.8. A lectina isolada de <i>Hypnea cervicornis</i> não interfere nos níveis das citocinas TNF- α e IL-1 no fluido peritoneal de ratos estimulados com carragenina	77
5.1.9. Lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> não altera a quimiotaxia <i>in vitro</i> induzida por MIP-2	77
5.1.10. A lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> inibe o edema de pata induzido por carragenina em ratos	80
5.1.11. A associação da HCA ao seu ligante específico inibe sua atividade antiedematogênica em ratos	80
5.1.12. A lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> não reduz a atividade edematogênica induzida por dextrana.....	80
5.2. Estudo da atividade antinociceptiva.....	84
5.2.1. A lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> diminui o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético: associação com mucina reverte esse efeito	84
5.2.2. A lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> apresenta atividade antinociceptiva somente na segunda fase no teste da formalina.....	84
5.2.3. Lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> não apresenta atividade antinociceptiva central avaliada pelo teste da placa quente	85
5.2.4. A coordenação motora de camundongos não é afetada pela administração da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i>	85
5.1.13. Lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> não promove toxicidade sub-crônica em ratos	94
5.1.14. A injeção de <i>Hypnea cervicornis</i> não promove alteração na pressão arterial de ratos	96
6. DISCUSSÃO	99
7. CONCLUSÕES	113
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

LISTA DE SIGLAS

ADP =	Adenosina Dinucleotídeo Fosfato
ALT =	Alanina Amino Transferase (enzima)
AMINO	Aminoguanidina
ANOVA =	Análise de Variância
ASC =	Área sob a Curva
AST =	Aspartato Amino Transferase (enzima)
ATP=	Adenosina trifosfato
BSA =	Albumina sérica bovina
CCK =	Colecistocinina
C3a =	Terceiro componente do sistema complemento ativado
C5a =	Quinto componente do sistema complemento ativado
Cg =	Carragenina
CGRP =	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês: Calcitonin Gene-related Peptide)
CXCR2 =	Receptor da classe 2 para quimiocina do tipo CXC
Da =	Daltons
DAINES =	Drogas antiinflamatórias não-esteroidais
Dexa =	Dexametasona (glicocorticoide)
EDRF =	Fator de relaxamento derivado do endotélio (do inglês: Endothelium Derived Relaxation Factor)
eNOS =	Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase (Endothelial form of nitric oxide synthase)
E.P.M =	Erro Padrão da Média
e.v. =	Endovenosa
FAD =	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN =	Flavina adenina mononucleotídeo
fMLP =	N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina
g =	Gramas
Glc-Nac =	N-acetilglicosamina
h =	Hora
HCA =	Aglutinina (lectina) de Hypnea cervicornis
HE =	Hematoxilina-Eosina
HETE=	Ácido hidroxi-eicosatetraenóico

ICAM-1e ICAM-2 =	Moléculas de adesão intercelular-1 e 2 (do inglês: Intercellular Adhesion Molecule)
IFN- α ou γ =	Interferon alfa ou gama
IL-1 =	Interleucina-1
IL-1 Ra=	Antagonista do receptor de IL-1 (do inglês: Interleukin 1 receptor antagonist)
IL-4 =	Interleucina-4
IL-6 =	Interleucina-6
IL-8 =	Interleucina-8
IL-10 =	Interleucina-10
IL-13 =	Interleucina-13
iNOS =	Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (do inglês: inducible form of nitric oxide synthase)
i.p. =	Intraperitoneal
kD =	Kilodaltons
L-NAME =	N ^{ω} -Nitro-L-arginina-metilester
L-NMMA =	N ^{ω} -Monometil-L-arginina
L-NIO =	L ^{δ} -iminoetil-L-ornitina
L-NA =	Nitro-L-arginina
L-NIL =	L-eminoetil-lisina
LPS =	Lipopolissacarídeo bacteriano
LTB ₄ =	Leucotrieno B ₄
LTC ₄ =	Leucotrieno C ₄
LTD ₄ =	Leucotrieno D ₄
LTE ₄ =	Leucotrieno E ₄
MCP =	Proteína quimiotática para monócitos
MCSF=	Fator estimulante de colônia de macrófago (do inglês: Macrophage colony-stimulating factor)
MIP-2 =	Proteína inflamatória de macrófagos
min =	Minuto
mg =	Miligrama
mL =	Mililitro
nm =	Nanômetros
nmol=	nanomols
NADPH =	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato associado com o íon hidrogênio

nNOS =	Isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase
NO =	Óxido nítrico (do inglês: Nitric oxide)
NOS =	Enzima óxido nítrico sintase (do inglês: Nitric oxide sintase)
NFκB=	Fator de transcrição nuclear Kappa B (do inglês: Nuclear factor Kappa B)
ODQ =	1H-(1,2,4) oxadiazolo (4,3- <i>a</i>) quinoxalin-1-ona (inibidor da guanilato ciclase solúvel)
PA =	Pressão arterial ou Para análise (soluções)
PAF =	Fator de ativação de plaquetas (do inglês: platelet activator factor)
PCAM-1 =	Molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta
PG=	Prostaglandina
PGD ₂ =	Prostaglandina da série D ₂
PGE ₂ =	Prostaglandina da série E ₂
PGF _{2α} =	Prostaglandina da série F do tipo 2
PGI ₂ =	Prostaglandina da série I ₂ (prostaciclina)
PMN =	Polimorfonucleares
RIPs =	Proteína inativadora de ribossomos (do inglês: ribosome inactivator proteins)
s =	Segundo
s.c. =	Subcutânea
SNC =	Sistema nervoso central
TNF-α =	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: tumoral necrosis factor-alpha)
TGF-β=	Fator transformador de crescimento-beta (do inglês: Transforming growth factor beta)
TXA ₂ =	Tromboxano A ₂
THB4 =	Tetra-hidro-biopterina
UI =	Unidades Internacionais
VCAM-1 =	Molécula de adesão vascular (do inglês: vascular adhesion molecule)
WGA =	Aglutinina do germe de trigo (do inglês: Wheat Germ Agglutinin)
µm =	Micrômetro
µL =	Microlitro
µg=	Micrograma
% =	Porcentagem

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> no teste de contorções abdominais induzido por ácido acético em camundongos.....	86
Tabela 2 – Efeito da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> no teste da formalina em camundongos.....	88
Tabela 3 – Efeito da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> no teste da placa quente em camundongos.....	90
Tabela 4 – Efeito da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> no teste do rota rod em camundongos.....	92
Tabela 5 – A lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> não altera parâmetros na avaliação da toxicidade sub-crônica em ratos	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Alga vermelha da espécie <i>Hypnea cervicornis</i> coletada na praia do Pacheco, litoral oeste do Ceará.	29
Figura 2- Seqüência de eventos leucocitários na inflamação.....	36
Figura 3- Mecanismo geral da dor.....	47
Figura 4 – Lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> reduz de forma dose-dependente a migração de neutrófilos (MN) induzida por carragenina em ratos.	71
Figura 5 – Associação da HCA ao seu ligante específico (Mucina) bloqueia seu efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos (MN) para a cavidade peritoneal de ratos.	71
Figura 6 – Desnaturação térmica da HCA inibe sua atividade antiinflamatória no modelo de peritonite em ratos.....	73
Figura 7 – HCA reduz a migração de neutrófilos induzida por fMLP em ratos de forma dose-dependente.	73
Figura 8 – Lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> diminui o rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos.....	75
Figura 9 – Lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> induz aumento de NO no sangue de ratos.	76
Figura 10 – Aminoguanidina e L-nitro revertem o efeito antiinflamatório da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> no modelo de peritonite induzida por Cg em ratos.....	76
Figura 11 – Lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> não altera os níveis de TNF- α e IL-1 no fluido peritoneal de animais no modelo de peritonite induzida por carragenina. ...	78
Figura 12 – Lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> não inibe a quimiotaxia de neutrófilos induzida por MIP-2 <i>in vitro</i>	79
Figura 13 – A lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> reduz a atividade edematogênica induzida por carragenina.....	81
Figura 14 – A atividade antiedematogênica da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> é revertida pela associação ao seu ligante específico mucina.....	82

Figura 15 – A lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> não reduz a atividade edematogênica induzida por dextrana.....	83
Figura 16 – A lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> diminui o número de contorções induzidas por ácido acético: mucina reverte esse efeito.....	87
Figura 17 – A lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> apresenta atividade analgésica periférica no teste da formalina..	89
Figura 18 – A lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> não apresenta atividade analgésica no teste da placa quente..	91
Figura 19 – A coordenação motora de camundongos não é afetada pela administração da lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> . ..	93
Figura 20 – A lectina de <i>Hypnea cervicornis</i> não altera a PA em ratos normais..	97

RESUMO

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DA LECTINA ISOLADA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea cervicornis* (J. Agardh). Flávio da Silveira Bitencourt. Orientadora: Prof^a. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2007.

Lectinas são (glico)proteínas que podem reconhecer e se ligar reversivelmente a carboidratos ou a outras substâncias derivadas de açúcares. São encontradas nos reinos vegetal e animal. *Hypnea cervicornis* é uma espécie de alga marinha vermelha encontrada no nordeste do Brasil da qual foi isolada a lectina *H. cervicornis* aglutinina (HCA), um polipeptídeo que contém 90 resíduos de aminoácidos (9193 Da) que se ligam especificamente a glicoproteínas do tipo mucina. O objetivo do presente trabalho foi estudar as atividades antiinflamatória e antinociceptiva, ainda não exploradas, da HCA. Foram utilizados camundongos *Swiss* albinos (20-35g) ou ratos *Wistar* (150-250g). Para o estudo da atividade antiinflamatória da HCA, os ratos foram injetados e.v. somente com a lectina nas doses de 10^{-2} ; 10^{-1} ; 1 e 10 mg/Kg (peritonite) ou a dose de 1 mg/Kg em associação com 5 mg/mL de mucina (1 mg/Kg). Após esse procedimento, os animais foram avaliados nos modelos de peritonite induzida Cg (quimiotático direto) ou por fMLP (quimiotático indireto). HCA (10^{-1} ; 1 e 10 mg/Kg) inibiu a peritonite induzida por Cg e por fMLP. Observamos que na peritonite induzida por Cg: A administração conjunta de HCA (1 mg/Kg) com mucina inibiu sua atividade antiinflamatória ($p < 0,05$), sugerindo participação do sítio lectínico nesta atividade; o aquecimento de HCA a 100°C , por 10 minutos, inibiu seu efeito antiinflamatório, indicando a importância de sua estrutura; a microscopia intravital mostrou que a HCA (10 mg/Kg) reduziu o rolamento e adesão de leucócitos; a lectina induziu a produção de óxido nítrico (NO, reação de Griess) no soro; Aminoguanidina e L-Nitro-Arginina inibiram a atividade da HCA; HCA não reduziu as concentrações de citocinas TNF- α e IL-1 no peritônio. A pressão arterial e o leucograma dos animais não foram alterados pela administração de HCA. A lectina não age diretamente sobre neutrófilos, pois não inibiu a quimiotaxia *in vitro* induzida por agente quimiotático (MIP-2). No edema de pata induzido por Dextrana ou Cg, HCA (1 mg/Kg) inibiu significativamente ($p < 0,05$) apenas o edema de pata induzido por Cg. O efeito antiedematogênico da HCA foi prevenido pela administração conjunta com mucina. HCA reduziu as contorções induzidas por ácido acético e seu efeito antinociceptivo foi prevenido pela administração conjunta com mucina. HCA diminuiu somente a segunda fase do teste da formalina. No teste da placa quente, HCA não apresentou efeito. A lectina também não alterou a atividade locomotora. A toxicidade sub-crônica foi avaliada pelo tratamento de ratos com HCA (1mg/kg), durante sete dias consecutivos, através de vários parâmetros: funções do rim (peso úmido, dosagem de creatinina e uréia) e do fígado (peso úmido, avaliação da cinética da aspartato amino transaminase e alanina amino transaminase), coração (peso úmido), estômago (peso úmido e avaliação visual de possíveis lesões), variação de massa corporal dos animais tratados e leucograma. Os resultados obtidos não mostraram qualquer alteração dos parâmetros avaliados, demonstrando que a HCA não apresenta nenhuma toxicidade nos animais. Em conjunto, esses dados revelam que a HCA apresenta atividade antiinflamatória e antinociceptiva que supostamente podem ser explicadas por bloqueio direto competitivo com carboidratos ligantes de selectinas e/ou indireto, via produção de NO, que diminuem o rolamento e adesão de leucócitos sobre o endotélio.

Palavras-chave: Lectina; *Hypnea cervicornis*; antiinflamatória; antinociceptiva, óxido nítrico.

ABSTRACT

STUDY OF ANTIINFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITIES OF A LECTIN ISOLATED FROM THE RED MARINE ALGA *Hypnea cervicornis* (J. Agardh). Flávio da Silveira Bitencourt. Supervisor: Dr. Nylane Maria Nunes de Alencar. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2007.

Lectins are (glyco)proteins that can recognize and reversibly bind to carbohydrates or other substances derived from sugars. They are found throughout animal and vegetal kingdoms. *Hypnea cervicornis* is a species of marine red algae found in Northeast of Brazil from which was isolated the lectin *Hypnea cervicornis* agglutinin (HCA), a polypeptide containing 90 amino acid residues (9193 Da) that binds specifically to mucin-type glycoprotein. The objective of this work was to study the anti-inflammatory and antinociceptive activities of HCA not yet known. Albine Swiss mice (20-35g) and Wistar rats (150-250g) were used. For the study of HCA anti-inflammatory activity, the rats were injected (i.v.) with lectin alone in the doses of 10^{-2} ; 10^{-1} ; 1 e 10 mg/Kg (peritonitis) or a dose of 1 mg/Kg associated to 5 mg/mL of mucin (1 mg/Kg). Following this procedure, the animals were evaluated in the peritonitis model induced by Cg (direct neutrophil chemoattractant) or by fMLP (indirect neutrophil chemoattractant). HCA (10^{-1} ; 1 and 10 mg/Kg) inhibited Cg- and fMLP-induced peritonitis. In Cg-induced peritonitis it was observed that: the administration of HCA (1mg/Kg) in association with mucin inhibited its anti-inflammatory activity ($p < 0.05$), suggesting the participation of the lectin site on this mechanism; heating HCA at 100°C , for 10 minutes, inhibited its anti-inflammatory effect, indicating the importance of its structure for that mechanism; the intravital microscopy showed that HCA reduced the rolling and adhesion of the leucocytes; the lectin induced the production of nitric oxide (NO Griess reaction) in serum; aminoguanidine and L-Nitroarginin inhibited the HCA activity; HCA did not reduce the concentrations of TNF- α and IL-1 in the peritoneum. The arterial pressure and the leukogram of the animals were not altered by the administration of HCA. The lectin does not act directly on neutrophils because it did not inhibit the *in vitro* chemotaxis induced by MIP-2, a chemotactic agent. In the carragenan (Cg)- or dextran-induced paw edema, HCA (1 mg/Kg) inhibited significantly ($p < 0.05$) only the Cg-induced paw edema. The antiedematogenic effect of HCA was prevented when it was administered in association with mucin. HCA reduced the writhes induced by acetic acid and its antinociceptive effect was prevented by the association with mucin. HCA only decreased the second phase of formalin test. In the hot plate, HCA did not show any effects. The lectin did not alter the motor coordination. The HCA subchronic toxicity was evaluated treating rats with a dose of 1mg/Kg during seven days and analys of several parameters: kidney functions (wet weight, creatinin and urea serum concentrations), liver functions (wet weight, kinetic of serum aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase), heart (wet weight) stomach (wet weight and visual evaluation of possible lesions), variation of body weight of treated animals and leukogram. The results showed no alterations of the evaluated parameters suggesting that HCA seems to be well tolerated by animals. The results taken together reveal that HCA presents anti-inflammatory and nociceptive activities which could be explained by direct competitive blockage with a common selectin carbohydrate ligand and/or indirectly, via NO production, which decrease of rolling and adhesion of leucocytes to endothelium.

Keywords: Lectin; *Hypnea cervicornis*; anti-inflammatory; antinociceptive; nitric oxide.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O estudo de lectinas tem sido amplamente relevante, quando se consideram estas proteínas excelentes modelos para o entendimento do reconhecimento proteína-carboidrato. A comunicação entre as células é de extrema importância para diversos processos fisiológicos e patológicos nas mais diferentes espécies. A investigação dos mecanismos envolvidos nessa interação celular passou a evidenciar a importância dos carboidratos nos processos bioquímicos.

Laine (1994) sugeriu que proteínas apresentam a capacidade de se ligar a carboidratos complexos e decifrar as informações por eles codificadas. Entre as proteínas envolvidas nesta ligação a resíduos glicídicos específicos estão as lectinas (BREWER *et al.*, 2002).

1.1. Lectinas: Definição e Classificação

Lectinas constituem uma classe de proteínas inicialmente descrita por Stillmark, em 1888, durante o desenvolvimento de sua tese de doutorado, as quais, nesta época, receberam o nome de fitohemaglutininas, uma vez que esse pesquisador demonstrou a aglutinação de eritrócitos na presença de extrato de sementes de *Ricinus communis* (citado em BEUTH *et al.*, 1995).

O termo lectina é derivado da palavra, do latim, “*legere*” que significa escolher (BOYD *et al.*, 1954) e foi aplicado devido à propriedade destas proteínas aglutinarem eritrócitos humanos de um grupo específico (MOREIRA *et al.*, 1991).

Sharon e Lis (1972) apresentaram o termo lectinas, como sendo proteínas aglutinadoras de células com especificidade de reconhecimento por carboidratos. Mais tarde, Goldstein *et al* (1980) ampliaram esse conceito, colocando lectinas como sendo proteínas/glicoproteínas de origem não imune com especificidade de ligação a carboidratos, e capazes de aglutinar células e/ ou precipitar glicoconjugados.

Pesquisadores defendiam que a expressão “de origem não imune” não poderia ser utilizada tendo em vista que a possível função destas proteínas nos

animais e em plantas envolvia a defesa imunológica contra antígenos de forma direta ou indireta, contudo as lectinas não se assemelhavam estruturalmente a anticorpos, embora muitas imunoglobulinas se ligassem a açúcares. A ênfase à origem não imune distingue as lectinas de anticorpos anti-carboidratos que também são capazes de aglutinar células. Enquanto as lectinas diferem em vários aspectos como a composição e seqüência de aminoácidos, peso molecular, requerimento de metais e estrutura tridimensional, os anticorpos são estruturalmente similares. Além disso, as lectinas também são encontradas em plantas e bactérias, que não possuem sistema imune (MOREIRA *et al.*, 1991).

Atualmente, o conceito mais aceito para lectinas é proposto por Peumans e Van Damme (1995) na qual lectinas são (glico) proteínas de origem não imune que possuem no mínimo um domínio não-catalítico e que se ligam reversivelmente e especificamente a um mono ou a um oligossacarídeo. Essa ligação a resíduos de carboidratos pode ser de alta especificidade sem, contudo alterar a estrutura química dos ligantes (GRANGEIRO, 1996).

A especificidade das lectinas é variável e está associada com a habilidade de interagir com acetilamino - carboidratos, amino - carboidratos, ácido siálico, hexoses, pentoses, e muitos outros carboidratos, além de terem a capacidade de precipitar polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos dotados de resíduos de açúcares específicos (SINGH *et al.*, 1999).

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

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

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

As Quimerolectinas possuem um ou mais sítios de ligação a carboidrato. Assim, contêm além dos domínios lectínicos, um domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica, agindo independente dos primeiros. Dependendo do número dos sítios de ligação a açúcares, as quimerolectinas se comportam como hololectinas, sendo as proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIPs – 2 – abrina e ricina), que além de possuírem atividade de N-glicosidase, possuem também dois sítios de ligação a carboidratos. As quitinases de plantas podem ser referidas como exemplo de quimerolectinas que se comportam como merolectinas. Isto acontece porque as quitinases possuem, além do domínio catalítico, um único domínio de ligação a carboidratos, sendo, portanto, incapazes de aglutinar e/ou precipitar.

As Superlectinas apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidrato, com especificidades diferentes, ou seja, possuem dois domínios carboidratos ligantes estruturalmente e funcionalmente distintos com capacidade de ligação a açúcares de estruturas diversas. Como exemplos deste grupo temos as lectinas de tulipa.

1.1.1. Efeitos biológicos de lectinas

As lectinas, nos últimos anos, se tornaram alvo de grandes descobertas de interesse clínico, como a “tipificação” de eritrócitos, carreamento de agentes quimioterapêuticos para células tumorais específicas, agentes mitógenos e marcadores taxonômicos de microrganismos.

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

A descoberta da patogênese de algumas doenças infecto-contagiosas como a pneumonia, abriu horizontes para o desenvolvimento de terapêuticas

alternativas baseadas no conhecimento sobre a interação lectínica. A exemplo disso, Beuth e colaboradores em 1995 conseguiram inibir a adesão de *Streptococcus pneumoniae* em pulmão de camundongos com a administração de Glc-NAc na traquéia dos mesmos.

O melhor entendimento acerca dessas proteínas também levou a um grande avanço no campo da oncologia, uma vez que já foi comprovado que lectinas promovem adesão de células tumorais a tecidos alvos e favorecem metástases (SHLYAKHOVENKO *et al.*, 1995). Mostrou-se ainda, que a circulação de células cancerígenas no sangue pode formar êmbolos devido a ações lectínicas (LOTAN e RAZ, 1988). Alguns autores também têm demonstrado atividade anti-tumoral (ANDRADE *et al.*, 2004) e indução de apoptose em células tumorais por lectinas vegetais (HOSTANSKA *et al.*, 2003).

Baseado nessas informações foi demonstrado a perda da habilidade de colonização de certas células tumorais a seus respectivos tecidos alvos, através de modificações de oligossacarídeos dos glicoconjugados existentes nas superfícies das células estudadas (SCHAAF-LAFONTAINE *et al.*, 1985). Destaca-se ainda a vantagem da associação de fármacos quimioterápicos a lectinas ligantes de glicoconjugados presentes na superfície de células tumorais, o que possibilita um direcionamento desses fármacos, bem como a diminuição da dose terapêutica das mesmas (GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

Lectinas influenciaram avanços na endocrinologia. Como exemplo, foi relatada a fosforilação do receptor para insulina, induzida por lectinas vegetais glicose/manose específicas *in vitro* (CAVADA *et al.*, 2003).

Têm sido demonstrados efeitos importantes sobre a contratilidade de músculo liso, pois o tratamento de coelhos com a ricina, uma lectina extraída da planta *Ricinus communis* (conhecida vulgarmente como mamona) aumentava significativamente a contração induzida por serotonina e histamina (ZHANG *et al.*, 1994). Posteriormente, foi demonstrado que a lectina do germe de trigo (WGA) e da alga vermelha *Bryothamnion triquetrum* estimulam a liberação do fator relaxante derivado do endotélio (KLEHA *et al.*, 1991; LIMA *et al.*, 2004).

No tocante as ações na inflamação e sistema imune, experimentos *in vitro* demonstraram que lectinas da subtribo Diocleinae foram capazes de provocar mitose em linfócitos humanos e induzir a produção de interferon- γ (BARRAL-NETO *et al.*, 1992; MACIEL *et al.*, 2004), além de estimular liberação de histamina

por mastócitos peritoneais de ratos (GOMES *et al.*, 1994). Foi demonstrado também que a lectina de soja e das leguminosas *Dioclea grandiflora*, *Canavalia brasiliensis* e *Vaitarea macrocarpa* são capazes de induzir migração de leucócitos e formação de edema de pata em ratos (BENTO *et al.*, 1993; ALENCAR *et al.*, 2003, 2004a, 2007; ALENCAR *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c; COELHO *et al.*, 2006; FREIRE *et al.*, 2003), o que vislumbra a melhora do tratamento de infecções, principalmente em pacientes imunossuprimidos. A ativação de neutrófilos pela lectina KM+ isolada de *Artocarpus integrifolia*, foi demonstrada sugerindo a expressão de CXCR2 na membrana dessas células (SILVA *et al.*, 2006). A produção de óxido nítrico *in vivo* e *in vitro* por células peritoneais murinas também tem sido relatada como atividade imunoestimulante (ANDRADE *et al.*, 1999).

Além destas atividades em modelos experimentais de inflamação, algumas lectinas como a WGA promoveram o aumento de permeabilidade vascular em intestino delgado, com provável ativação de proteína quinase C (NORTHOVER e NORTHOVER, 1994). Assreuy *et al.* (2002, 2003) demonstraram que uma lectina animal, originada do sêmen de porco, denominada como espermadesina, induz migração de neutrófilos através da liberação de uma substância quimiotática liberada por macrófagos, provavelmente TNF- α e que o mastócito modula de forma negativa esta atividade.

Apesar do potencial pró-inflamatório bem comprovado, resultante da administração local de lectinas, nosso grupo demonstrou que, lectinas quando administradas endovenosamente, apresentam potente ação antiinflamatória (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 2005; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006; MOTA *et al.*, 2006). Além da inibição de eventos inflamatórios agudos, demonstrou-se ainda que estas lectinas previnem a lesão urotelial no modelo de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos (ASSREUY *et al.*, 1999). Em trabalho recente, demonstrou-se também que o potencial antiinflamatório da lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus*, anteriormente demonstrado por Alencar e colaboradores, (1999 e 2005), é em parte, devido à habilidade desta lectina em inibir o rolamento e adesão dos leucócitos no endotélio vascular *in vivo* (NAPIMOGA *et al.*, 2007).

1.2. Algas marinhas

As algas são talófitas (plantas sem raízes, caules e folhas) que têm a clorofila a como seu pigmento fotossintético principal (LEE, 1997). Em relação ao habitat, as algas são predominantemente aquáticas, sendo encontradas no mar, em água estuárias, dulcícolas e em superfícies úmidas. Sua distribuição depende da temperatura e salinidade da água, disponibilidade de luz solar, correntes dos oceanos e das condições físicas e químicas afins (RAVEN *et al.*, 1996).

As algas, do ponto de vista botânico, são classificadas de acordo com a estrutura física, função e ciclo reprodutivo em: Chlorophyta (algas verdes), Phaeophyta (algas pardas) e **Rodophyta** (algas vermelhas) (RAVEN *et al.*, 1996).

1.2.1. Lectinas de algas marinhas: efeitos biológicos

As algas marinhas tropicais têm se mostrado uma rica fonte de compostos bioativos com potencial biomedicinal. O emprego de algas marinhas em aplicações biológicas é bastante recente, mas apesar de serem poucos os trabalhos, sabe-se que estas representam um grande potencial de aplicação.

Através do aprimoramento dos métodos de “screening” farmacológico, o papel dos produtos naturais na descoberta de novas drogas tem aumentado nos últimos anos. Tal fato pode ser observado principalmente quando se trata de produtos naturais marinhos, os quais mostram uma interessante diversidade de estruturas químicas novas com potentes atividades biológicas (KÖNIG & WRIGHT, 1996).

Estudos envolvendo lectinas de algas marinhas têm tido um substancial progresso ao longo dos últimos quinze anos e padrões de características começam a aparecer. A maioria das lectinas de algas marinhas é de pequeno tamanho molecular quando comparadas com aquelas derivadas de plantas terrestres. E essa característica pode fazer dessas proteínas moléculas mais apropriadas para o uso como mísseis biológicos, pois o menor tamanho dessas moléculas implicaria em uma menor reação antigênica (ROGERS & HORI, 1993).

Sabe-se que as características de reconhecimento de estruturas de açúcares e glicoconjugados dessas proteínas fazem delas importantes

ferramentas para o reconhecimento e isolamento desses tipos moleculares, sejam eles em soluções ou presentes em membranas biológicas.

Nos últimos anos o estudo com lectinas de algas tem sido intensificado. Significantes efeitos antiinflamatório e antinociceptivo foram demonstrados para algumas espécies de alga marinhas, como, *Chlorella stigmatophora*, *Phaeodactylum tricornutum* (GUZMAN *et al.*, 2001) e *Amansia multifida* (NEVES *et al.*, 2007). Adicionalmente, a atividade antioxidante foi demonstrada para o gênero *Sargassum* (LIM *et al.*, 2002). Lectinas de duas espécies de alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* e *Bryothamnion seaforthii* apresentaram atividades antinociceptiva (VIANA *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2004) e hemaglutinante (AINOUZ *et al.*, 1995) e efeitos pró-inflamatórios, *in vivo* e *in vitro*, estimulando migração de neutrófilos (NEVES *et al.*, 2001). Lectinas isoladas das algas vermelhas *Hypnea cervicornis* e *H. musciformis* mostraram atividades bactericidas e hemaglutinantes (NASCIMENTO *et al.*, 2006; SIDDIQUI *et al.*, 1993).

Dalton *et al* (1995) observaram que as lectinas das algas marinhas *Chondria dasyphylla*, *Rhodymenia pseudopalmata* e *Gracilaria sp.*, estimularam a mitogênese em esplenócitos murinos, enquanto que as lectinas de *Chondria dasyphylla*, *Codium decorticatum*, *Gracilaria sp.*, *Gracilaria tikvahiae* e *Gelidium pusillum* estimularam mitogênese em linfócitos humanos.

Estas demonstrações sugerem as algas, como uma importante fonte de substâncias com potencial aplicações farmacológicas.

1.2.2. Lectina de algas marinhas vermelhas: *Hypnea cervicornis*

Lectinas de algas marinhas vermelhas diferem daquelas de vegetais superiores em várias propriedades. Em geral, elas apresentam pequena massa molecular e não reconhecem açúcares simples, sendo mais específicas para oligossacarídeos complexos, em especial glicoproteínas. Além disso, muitas das lectinas de algas marinhas não requerem cátions divalentes para exercerem suas atividades biológicas (ROGERS & HORI, 1993).

Espécies do gênero *Hypnea* têm sido alvo para o isolamento e estudo estrutural de lectinas. Hori *et al* (2000) determinaram a estrutura da lectina isolada da alga vermelha *Hypnea japonica* por degradação de Edman. Posteriormente, Nagano *et al* (2002 e 2005 a,b) purificaram e cristalizaram a lectina presente na alga da espécie *Hypnea musciformis*.

Hypnea cervicornis (J. Agardh), espécie pertencente a Família Hypneaceae, Ordem Gigartinales, Divisão Rhodophyta, é alga encontrada na costa atlântica do Brasil, mais especificadamente, no litoral do Estado do Ceará e na costa pacífica do Japão. (Figura 1).

A aglutinina (lectina) isolada de *Hypnea cervicornis* (*Hypnea cervicornis* “agglutinin” – HCA) é uma proteína homóloga à isolada da *Hypnea musciformis*. A sua estrutura primária (9193 ± 3 Da) consiste numa mistura polipeptídica de 90 resíduos de aminoácidos, sendo seus ligantes de maior especificidade glicoproteínas do tipo O-Glicana (mucina submaxilar bovina) (NAGANO *et al.*, 2005a).



Figura 1. Alga vermelha da espécie *Hypnea cervicornis* coletada na praia do Pacheco, litoral oeste do Ceará.

1.3. Inflamação

O termo inflamação ou flogose (do latim, *inflamare* e do grego *phlogos*, que significa pegar fogo) retrata como os povos mais primitivos comparavam uma

região inflamada com algo relativo a chamas, quente ou ardido. Essa analogia deve ter surgido nos tempos do primeiro contato do homem com o fogo, antes mesmo do controle de sua produção e manipulação.

A civilização egípcia antiga deixou, em hieróglifos, os primeiros registros com relatos médicos sobre a identificação e tratamento da inflamação, através do uso de procedimentos e fórmulas (FALTAS, 2004).

A inflamação é caracterizada por quatro sinais cardinais, desde Celsus, “rubor, calor, tumor e dor”. No século XIX, Rudolf Virchow, atribuiu a descrição do quinto sinal (perda da função). [MONTENEGRO *et al.*, 1999].

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

É um processo multimediado e seus sinais e sintomas podem ser definidos como a expressão dos efeitos da mobilização endógena de mediadores que atuam localmente (DI ROSA *et al.*, 1971).

A cinética do processo inflamatório ocorre em dois momentos. O primeiro que é desencadeado logo após a infecção (inflamação aguda), tem duração que varia de algumas horas até poucos dias entre o início, o desenvolvimento e o término. Essa fase caracteriza-se por infiltrado predominantemente neutrofílico no sítio da inflamação, eventos vasculares tais como extravasamento de material protéico e plasma, aumento da permeabilidade vascular, alterações estruturais da microvasculatura e eventos sistêmicos tais como aumento da temperatura, dor, elevação do conteúdo plasmático de várias proteínas, que se denominam proteínas de fase aguda, por exemplo: α -2 macroglobulina, componentes C3 e C5 do complemento, proteína C-reativa, fibrinogênio, entre outras (BAUHMANN & GAUDIE, 1994).

O segundo que depende ou não da resolução do processo na fase aguda (inflamação crônica), caracterizado pela presença de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese e proliferação de tecido conjuntivo. A inflamação crônica é considerada um processo prolongado que pode ter semanas ou até anos de duração. Pode ser observada, na fisiopatologia de muitas doenças, como a tuberculose, artrite reumatóide e a doença pulmonar obstrutiva crônica.

As características apresentadas tanto pela inflamação aguda como crônica podem ser divididas em eventos vasculares e celulares.

1.3.1. Eventos vasculares

Imediatamente após a lesão ocorre uma vasoconstrição reflexa, de origem neurogênica, mediada por terminações do sistema nervoso autônomo que dura poucos segundos. A seguir, tem início a vasodilatação, que primeiro envolve as arteríolas, levando a abertura de novos leitos capilares e aumento do fluxo sanguíneo para a região, provocando calor e rubor.

Nos vasos de pequeno calibre ocorrem modificações que permitem a passagem de proteínas plasmáticas para o espaço extracelular, provocando aumento da pressão oncótica e retenção de água no interstício (edema). O fluido rico em proteínas é chamado de exsudato. Ocorre também a estase sanguínea advinda do aumento de permeabilidade da microvasculatura, uma vez que o extravasamento de líquidos e proteínas para o interstício provoca hemoconcentração, aumentando a viscosidade sanguínea e gerando o alentecimento da circulação. Essas alterações são causadas por substâncias liberadas no local da inflamação, conhecidos como mediadores inflamatórios. Entre esses temos vários mediadores químicos, incluindo-se a bradicinina, a serotonina, a histamina e as prostaglandinas da série E e da série I. Estes dois últimos são metabólitos do ácido araquidônico, formados através da ativação da via das ciclooxigenases. Essas enzimas coexistem nas isoformas constitutivas, que produzem prostaglandinas em quantidades fisiológicas, e nas isoformas induzidas, que produzem prostaglandinas em grandes quantidades, sendo estas as principais responsáveis pelos eventos inflamatórios (BHANDARI *et al.*, 2005). Alguns desses mediadores, como a bradicinina, causam dilatação induzindo a

liberação de fatores de relaxamento vascular derivados do endotélio (EDRFs). Já foi demonstrado que o óxido nítrico (NO) é um dos EDRFs liberados pelas células endoteliais (PALMER *et al.*, 1987; MONCADA *et al.*, 1991), que participa do controle do fluxo sanguíneo (FORTES *et al.*, 1994), da expressão de moléculas de adesão e do aumento da permeabilidade vascular induzida pelo fator ativador de plaquetas (PAF) e pela própria bradicinina (MAYHAN, 1992).

O aumento da permeabilidade vascular pode ocorrer por diferentes mecanismos, dependendo dos receptores ativados na célula endotelial ou da lesão provocada no vaso sanguíneo. Propõe-se que a histamina e leucotrienos causam contração endotelial; interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) participam da reorganização citoesquelética endotelial; leucócitos ou agentes agressores provocam lesão vascular direta e extravasamento de fluidos; fator de crescimento endotelial vascular gera aumento da transcitose e neovascularização, que também provoca extravasamento de fluidos. O exsudato contém vários mediadores que influenciam as células adjacentes e os próprios vasos sanguíneos e incluem os componentes de quatro cascatas enzimáticas do plasma: sistema do complemento, sistema da coagulação, sistema fibrinolítico e sistema das cininas (ROBBINS *et al.*, 2005).

1.3.2. Eventos celulares

O processo da migração de leucócitos (principalmente neutrófilos) durante a resposta inflamatória é intermediado por diferentes mediadores inflamatórios e quimiotáticos, os quais promovem um aumento nas interações entre os neutrófilos e as células endoteliais, favorecendo a migração destes leucócitos a favor do gradiente de concentração entre a área lesada e as vênulas pós-capilares (HUTTENLOCHER *et al.*, 1995).

Diversas são as células envolvidas no processo inflamatório, algumas células já estão presentes no tecido afetado, tais como: células endoteliais, mastócitos e células mononucleares residentes. Enquanto outras como os leucócitos polimorfonucleares (PMN) (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos) migram para o local da lesão. Os leucócitos são atraídos para a região afetada por um processo conhecido como

quimiotaxia. Os macrófagos residentes participam de vários eventos da inflamação são responsáveis pela fagocitose do agente agressor, pela liberação de vários mediadores desencadeando outros eventos inflamatórios como edema e dor (FERREIRA, 1980). Eles atuam na iniciação da mobilização de neutrófilos em direção ao local agredido.

O processo de passagem de leucócitos provenientes do sangue para um tecido inflamado apresenta-se em cinco eventos: marginação; rolamento; adesão; diapedese com penetração através da membrana basal dos pericitos (transmigração através do endotélio); e quimiotaxia e/ou haptotaxia (migração no tecido intersticial em resposta ao estímulo quimiotático). A identificação de moléculas com propriedades adesivas envolvidas neste processo, mostrou que a migração de leucócitos para o foco inflamatório depende de uma interação entre estas células e as células endoteliais, na qual ambas contribuem ativamente através da expressão em suas superfícies de proteínas adesivas, denominadas moléculas de adesão e secreção de mediadores solúveis.

As selectinas têm sido extensivamente estudadas, são lectinas que interagem com açúcares e/ou glicoproteínas, são responsáveis pela adesão de leucócitos ao endotélio vascular na cascata precoce de eventos que levam aos processos de inflamação. Elas são necessárias para a migração de leucócitos, sendo o passo inicial na seqüência dos eventos que resultará no extravasamento dos neutrófilos nos sítios de injúria. A interação das selectinas com seus ligantes resulta num declínio dramático da velocidade dos neutrófilos, o que permite que as proteínas conhecidas como integrinas promovam ligamentos firmes dos neutrófilos com o endotélio. O processo de adesão do leucócito vascular se dá através dessas proteínas. As moléculas de adesão conferem à célula um tipo de endereço. Elas podem ancorar células em tecidos específicos ou "endereçar" células migrantes a determinadas regiões do corpo. Estruturalmente, as selectinas apresentam, um domínio lectínico (responsável pela sua propriedade adesiva) e uma série de domínios semelhantes às proteínas do complemento (CRONSTEIN E WEISSMAN, 1993; ROSSITER *et al.*, 1997).

Embora as lectinas endógenas (selectinas) estejam envolvidas no processo de adesão, elas não são as únicas a participarem deste, pois outras moléculas como as imunoglobulinas e as integrinas também contribuem para o mesmo. No

entanto, demonstrou-se que as selectinas estão principalmente envolvidas com a fase de rolamento dos leucócitos (PANÉS *et al.*, 1999).

Os três tipos de selectinas conhecidos foram denominados de acordo com o tecido no qual eles foram identificados:

- As L-selectinas são encontradas nos leucócitos e são responsáveis pelo endereçamento (i.e., *homing*) durante a interação com ligantes endoteliais (KANSAS, 1996);
- As E-selectinas aparecem nas células endoteliais após terem sido ativadas por citocinas inflamatórias, sendo que uma pequena quantidade encontrada em vários leitos vasculares parecem ter significado importante para a migração dos leucócitos;
- As P-selectinas são armazenadas em alfa-grânulos das plaquetas e corpos de Weibel-Palade (i.e., vesículas intracitoplasmáticas) das células endoteliais, e são prontamente posicionadas na membrana plasmática após uma estimulação específica.

Conforme já mencionado, o tipo de leucócito que migra varia com o estímulo e com a fase do processo inflamatório (GRANGER & KUBES, 1994). Por exemplo, na inflamação aguda, os neutrófilos polimorfonucleares predominam no infiltrado leucocitário durante as primeiras 6-12 horas, sendo substituídos por mononucleares entre 24 e 48 horas. Esta seqüência pode ser explicada pela ativação de diferentes moléculas de adesão e fatores quimiotáticos específicos para cada tipo celular.

O advento dos leucócitos aos locais inflamados ocorrendo em intensidade adequada e em tempo hábil pode ser fundamental para a manutenção da normalidade. No entanto, em diversas situações, a expressão desta reação, isto é, tanto o excesso quanto a falta dessas células no foco da lesão, pode resultar em danos ao organismo. E, isso, é importante porque os leucócitos ingerem agentes ofensivos, destroem bactérias e outros micróbios e degradam o tecido necrótico e antígenos estranhos, mas podem prolongar a inflamação e induzir lesão tecidual liberando enzimas, mediadores químicos e radicais tóxicos de oxigênio e de nitrogênio (BEVILACQUA *et al.*, 1994). A mobilização adequada dos

leucócitos, da microcirculação para o local da inflamação, é uma das fases fundamentais da reação inflamatória.

No sítio da inflamação ocorre um extravasamento de leucócitos. Neste processo, ocorre inicialmente a vasodilatação de vênulas pós-capilares e mudanças no fluxo sanguíneo (i.e., desaceleração), resultando na marginação dos leucócitos ao longo do endotélio vascular, processo este mediado por selectinas e seus ligantes-opostos, ricos em carboidratos (KNOL *et al.*, 1994).

À medida que o leucócito rola, as L-selectinas se despreendem e suas integrinas são ativadas por pelo menos uma variedade de quimiocinas e citocinas quimiotáticas associadas à superfície endotelial.

Após o rolamento, segue-se a adesão firme mediada por imunoglobulinas e β -2 integrinas. Essas últimas são proteínas presentes na membrana dos leucócitos e que podem ter sua expressão aumentada após a ativação destas células por mediadores inflamatórios como o PAF ou outras citocinas. As ICAMs (imunoglobulinas de adesão) são moléculas que estão presentes no endotélio, sendo que as mais ligadas ao processo de migração são: ICAM-1 (Moléculas de adesão intercelular-1), ICAM-2 (Moléculas de adesão intercelular-2), VCAM-1 (molécula de adesão vascular) e PCAM-1 (molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta). Mediadores inflamatórios liberados por células residentes ativadas podem agir aumentando a avidéz de ligação entre as moléculas de integrinas e imunoglobulinas, favorecendo a adesão firme (CRONSTEIN e WEISSMAN, 1993; PANÉS *et al.*, 1999).

Após a firme fixação ocorre o achatamento da célula, reduzindo a exposição às forças decorrentes do fluxo sanguíneo vascular, aumentando-se desta forma a área de contato com a superfície endotelial vascular. Finalmente o leucócito migra entre as células endoteliais da região apical para a superfície basolateral (diapedese) em direção ao extravascular.

Assim, após o extravasamento, os leucócitos emigram nos tecidos em direção à região de agressão por um processo denominado de quimiotaxia ou locomoção através de um gradiente químico (Figura 2). Esse processo é controlado por agentes quimiotáticos, tanto de origem endógena, que são aqueles liberados pelas próprias células do hospedeiro (componentes do sistema

complemento, produtos da lipoxigenase, citocinas etc.), quanto de origem exógena, que são aqueles advindos do próprio agente agressor (produtos bacterianos de origem lipídica e N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina, fMLP) (RIBEIRO *et al.*,1991; 1996).

Os agentes quimiotáticos também podem ser classificados como agentes diretos, que agem atraindo diretamente a célula imune [LTB₄ (leucotrieno do tipo B₄), C5a (quinto componente do sistema complemento ativado), (fMLP), IL-8 (interleucina-8)], ou agentes indiretos Carragenina (Cg), que agem estimulando as células residentes (macrófagos, mastócitos, fibroblastos etc.) a liberar agentes quimiotáticos diretos (IL-8, LTB₄, IL-1, TNF- α) (RIBEIRO *et al.*,1991; 1996).

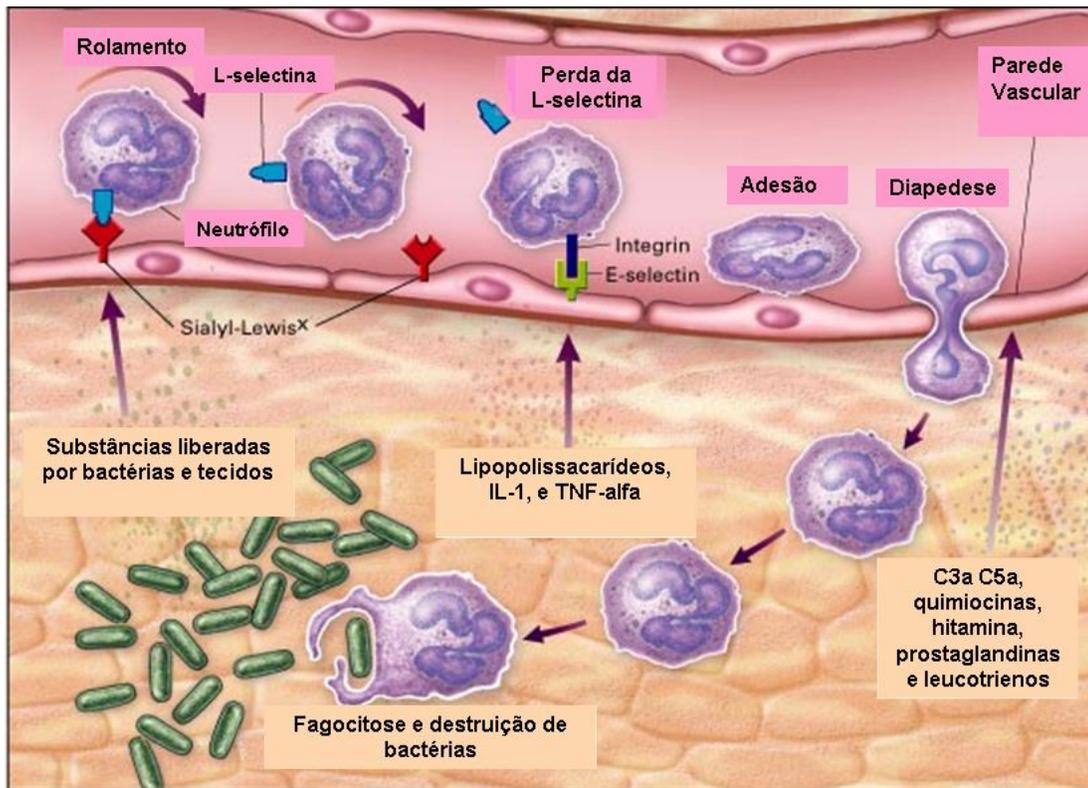


Figura 2. Seqüência de eventos leucocitários na inflamação. A figura representa às etapas de rolamento, adesão e migração celular ativadas após a invasão tecidual por bactérias, bem como a liberação de mediadores locais, que estarão estreitamente relacionados aos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória. Modificado de: <www.chronicprostatitis.com/images/f3.jpg> Acesso em 05 jun. 2007.

1.3.3. Mediadores da inflamação

Em termos simples, um mediador pode ser considerado como um mensageiro químico que tem ação nos vasos sanguíneos e/ou células e contribuem para a resposta inflamatória. (LANSEN *et al.*, 1993).

Tais substâncias modulam uma série de eventos locais, sendo os principais vasodilatação, opsonização, quimiotaxia para células inflamatórias, destruição tecidual e dor, como também febre e mal estar. Os mediadores químicos da inflamação podem ser de origem plasmática ou tecidual (SIQUEIRA & DANTAS, 2000).

PLASMÁTICA:

- Sistema das cininas;
- Sistema complemento (C3a; C5a; C5b-C9);
- Sistema de coagulação;
- Sistema fibrinolítico;

TECIDUAL:

- Aminas vasoativas: histamina e serotonina (mastócitos e plaquetas);
- Derivados do ácido araquidônico (fosfolípidos da membrana);
- Enzimas lisossomais (neutrófilos e mastócitos);
- Radicais livres do oxigênio (leucócitos);
- Fator ativador de plaquetas-PAF (leucócitos e mastócitos);
- Citocinas (macrófagos e linfócitos ativados);
- Quimiocinas (principalmente macrófagos ativados);
- Óxido nítrico (macrófagos e endotélio);
- Fatores de crescimento.

As aminas vasoativas, histamina e serotonina, liberadas dos mastócitos e das plaquetas podem ser identificadas no início da inflamação aguda. A histamina é o primeiro mediador a atuar; gerando o aumento da permeabilidade vascular e uma contração do endotélio venular com alargamento de junções celulares interendoteliais. A serotonina apresenta ações semelhantes as da histamina, correspondendo a um segundo mediador pré-formado (ROBBINS *et al.*, 2005).

As prostaglandinas originadas da conversão do ácido araquidônico também agem como importantes substâncias vasodilatadoras. A liberação do ácido araquidônico ocorre como consequência da estimulação específica de receptores da superfície celular e da subsequente ativação de fosfolipases do tipo A_2 . Vários tipos de células liberam ácido araquidônico em resposta a diferentes estímulos tais como bradicinina, angiotensina II, vasopressina, trombina, colágeno, adrenalina, ADP, peptídeos quimiotáticos e histamina (CARVALHO, 1990).

Dois grandes rotas do metabolismo do ácido araquidônico em células de mamíferos correspondem a via da ciclooxigenase e a via da lipoxigenase. Prostanóides incluindo prostaglandinas e tromboxano A_2 são produzidos por fosfolipases A_2 e ciclooxigenase e leucotrienos são produzidos por 5-lipoxigenase (YOSHIKAI, 2001).

As prostaglandinas podem participar de reações alérgicas. Efeito biológico de prostaglandinas produzido durante a reação de mastócitos em tecidos incluem a modulação da musculatura lisa e contração, permeabilidade vascular, sensação de prurido e dor e agregação plaquetária (WHITE, 1999).

A via da ciclooxigenase conduz a geração de prostaglandinas (PG) que incluem PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 (prostaciclina) e tromboxano (TXA_2), todos derivados da ação de enzimas específicas (ROBBINS *et al.*, 2005).

Na via da lipoxigenase a 5-lipoxigenase é a enzima predominante dos neutrófilos. O produto principal, a HETE, que é quimiotática para neutrófilos é convertida em uma série de compostos conhecidos como leucotrienos. Dentre os leucotrienos mais importantes está o LTB_4 , que causa aderência de neutrófilos ao endotélio das vênulas pós-capilares, sendo também um potente agente quimiotático para neutrófilos. O LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular (SIQUEIRA & DANTAS, 2000).

1.3.3.1. Citocinas

As citocinas são fatores solúveis de baixo peso molecular, liberadas principalmente por células ativadas com a finalidade de mediar informações, bem como modular a função destas células por meio da ativação de receptores de

superfície (DINARELLO, 2000; OPPENHEIM, 2001; HOLLOWAY *et al.*, 2002). Como mediadores solúveis, sua função pode ser autócrina, parácrina ou sistêmica. Estes mediadores são liberados por grande parte das células do organismo e tem uma variedade de funções (TYSON *et al.*, 2001). O efeito biológico depende da citocina liberada e do tipo de célula envolvida. De um modo geral, as citocinas influenciam a ativação, a divisão, a apoptose e a quimiotaxia celular. Estas podem também estar envolvidas na diferenciação celular, na inflamação, na imunidade e no reparo tecidual (PARKIN & COHEN, 2001; HANADA & YOSHIMURA, 2002).

As citocinas ligam-se a receptores específicos e de alta afinidade na célula-alvo, ativando-as; na maioria dos casos, são supra-regulados na célula quando são estimulados. A maioria das citocinas exerce ação em receptores ligados à quinase, que regulam cascatas de fosforilação afetando assim sua expressão gênica (PHILIP *et al.*, 2004).

As citocinas são classificadas em subgrupos, como: interleucinas, fatores de crescimento, quimiocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia ou ainda podem ser classificadas conforme sua atividade biológica como: pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF α e TGF β) e antiinflamatórias (IL-1Ra, IL-4 e IL-10) (CAVAILLON, 2001; WONG *et al.*, 2003).

Segundo Robins *et al* (2005), além de ações diretas sobre as células, algumas citocinas induzem a formação de outras citocinas (formando uma cascata de amplificação), enquanto algumas induzem a expressão dos receptores de outras citocinas, outras podendo apresentar interações sinérgicas ou antagônicas com outras citocinas. A IL-6, por exemplo, é uma citocina multifatorial secretada por todas as células quando lesadas ou ativadas por IL-1 e/ou TNF- α . De outro modo, citocinas como a IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e IFN- α são eficientes em inibir *in vitro* a síntese de IL-1 e TNF- α . As citocinas incluem peptídeos tanto pró-inflamatórios quanto antiinflamatórios.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que apresenta papel chave em diversos processos, como a inflamação, imuno-modulação, crescimento, angiogênese e citotoxicidade (AGGARWAL & NATARAJAN, 1996; TAYLOR *et al.*, 2004). Está bem descrito na literatura, a participação do TNF- α no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (CANETTI *et al.*, 2001; SAUNDERS *et al.*,

2005). Embora, o TNF- α não seja considerado um fator quimiotático clássico, uma vez que não induz migração de neutrófilos *in vitro*, este promove a síntese e liberação de fatores quimiotáticos, como as quimiocinas, tanto pelas células endoteliais quanto pelas células residentes (FACCIOLI *et al.*, 1990).

Outra citocina importante na inflamação é a IL-1, com funções semelhantes ao TNF- α , participando como mediador primário da resposta inflamatória do hospedeiro frente a infecções e outros estímulos inflamatórios. A IL-1 possui duas formas chamadas de IL-1a e IL-1b, com 30% de homologia entre elas, compartilhando os mesmos receptores e ações biológicas. Esta citocina é primeiramente sintetizada como um precursor de 33 kD, sendo secretada com 17 kD. A IL-1a é ativa em ambas as formas, enquanto a forma ativa da IL-1b é apenas o produto clivado. Deste modo, a IL-1b é proteoliticamente clivada por uma protease chamada de enzima conversora da IL-1b, gerando a proteína biologicamente ativa (GUBLER *et al.*, 1986; HUANG *et al.*, 1988; SCAPIGLIATI *et al.*, 1991). Em baixas concentrações a IL-1 age como um mediador local da inflamação, aumentando a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais. Em altas concentrações a IL-1 chega ao sistema circulatório e passa a exercer efeitos endócrinos como febre e indução da síntese de proteínas plasmáticas de fase aguda pelo fígado. Assim como o TNF- α , a IL-1 também induz a síntese e secreção de quimiocinas e citocinas, induzindo indiretamente a migração de neutrófilos para o foco inflamatório (FACCIOLI *et al.*, 1990; PERRETTI & FLOWER, 1993). Além disso, estudos demonstram a participação da IL-1 em patologias com elevada presença de neutrófilos, como na artrite e inflamação pulmonar (DRISCOLL *et al.*, 1995; NIKI *et al.*, 2001).

1.3.3.2. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre formado endogenamente por uma família de enzimas, óxido nítrico sintases (NOS, EC 1.1413.399) (EISERICH *et al.*, 1998), através da conversão de L-arginina em L-citrulina. Nos líquidos orgânicos, o NO produzido se oxida nos ânions nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), sequencialmente (IGNARRO, 1990, MONCADA *et al.*, 1991). Foram identificadas três diferentes isoformas de NOS em células de mamíferos (produtos de

diferentes genes): NOS endotelial (eNOS ou NOS III) em células endoteliais, epiteliais e miócitos cardíacos; NOS neuronal (nNOS ou NOS I) em neurônios, células musculares esqueléticas e neutrófilos (GREENBERG, *et al.*, 1998) e a NOS induzida (iNOS ou NOS II), em macrófagos, hepatócitos, células musculares lisas (TITHERADGE, 1999).

A eNOS e nNOS são classificadas como enzimas constitutivas e dependentes de cálcio, enquanto que a iNOS é classificada como uma enzima induzida, cujas ações independem de cálcio. A ativação de todas as enzimas NOS necessita dos seguintes cofatores: calmodulina, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina adenina mononucleotídeo (FMN), tetrahidrobiopterina (THB4) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) (TITHERADGE, 1999).

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

Além de promover o relaxamento da musculatura lisa, o NO desempenha outros papéis importantes na inflamação. Reduz a agregação e adesão plaquetária, é citotóxico para determinados micróbios e células tumorais (ROBBINS *et al.*, 2005). Células endoteliais produzem e liberam NO, após a estimulação por citocinas como MCP-1, IL-6, M-CSF, ICAM-1 e VCAM-1 (TEDGUI & MALLAT, 2001).

A expressão de NOS_i é regulada via fator de transcrição nuclear, dentre eles cita-se o fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB) (ALDERTON *et al.*, 2001). Esta enzima pode ser induzida em células como macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos, após estímulo por lipo-polissacarídeos (LPS), citocinas (IL-1β, TNFα, IFN-γ, IL-6), entre outros (CHAN & FISCUS, 2004).

Eventos patológicos têm sido associados à liberação excessiva de NO, tais como o choque séptico (THIERMERMANN & VANE, 1990), doenças

neurodegenerativas (JENNER & OLANOW, 1996), inflamação aguda e crônica, doenças auto-imunes e aterosclerose (RANG *et al.*, 2003). Foi proposto que níveis elevados de NO estariam associados a dano tecidual nessas patologias. Assim, agentes capazes de modular a atividade das NOS, particularmente a NOS_i, teriam um considerável valor terapêutico.

Análogos estruturais da L-arginina, estão entre os principais inibidores das NOS. Eles competem com o substrato L-arginina pelo sítio de ligação nas NOS. O primeiro inibidor descrito, N^ω-monometil-L-arginina (L-NMMA). Outros análogos descritos temos: L^δ-iminoetil-L-ornitina (L-NIO), Nitro-L-arginina (L-NA) e N^ω-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Embora esses análogos estruturais da L-arginina sejam potentes inibidores das NOS, normalmente demonstram pouca seletividade para as distintas isoformas da NOS (REES *et al.*, 1990).

Os derivados da L-citrulina como a L-tiocitrulina (inibidor não-seletivo da NOS) e S-metil-L-tiocitrulina (potente inibidor da nNOS) exercem sua atividade através de ligação à enzima, impedindo a ativação do oxigênio molecular. A L-ε-iminoetil-lisina (L-NIL), análogo estrutural de aminoácidos, apresenta seletividade para a isoforma induzida (CONNOR *et al.*, 1995; PELLETIER *et al.*, 1999; PELLETIER *et al.*, 2000).

Está demonstrado que a aminoguanidina (AMINO) inibe seletivamente a iNOS (CORBETT *et al.*, 1992). Esta é um agente não análogo da L-arginina, tais como as guanidinas, tem sido utilizado com fins para inibição seletiva da iNOS. Porém, normalmente são necessárias doses elevadas de AMINO para se obter inibição significativa da iNOS. Assim, nessas condições, é provável que AMINO iniba também as isoformas constitutivas (LASZLO *et al.*, 1995).

Um outro inibidor da NOS, N-(3-(Aminometil)-benzil)-acetamidina (1400 W), não guarda relação estrutural com a L-arginina e é cerca de 5000 vezes mais potente para iNOS em relação a eNOS (GARVEY *et al.*, 1997).

1.4. Dor

A presença da dor e seu significado têm sido o martírio da humanidade e suas causas e conseqüências motivos de especulações. Desde a antiguidade o homem sempre procurou esclarecer as razões que justificassem a ocorrência de dor e os procedimentos destinados para seu controle. A dor é um sintoma de

muitas desordens clínicas e afeta grande parte da população. Ela é uma característica cardinal dos mecanismos protetores fisiológicos normais e uma das suas funções é preservar o organismo, evitando o dano tecidual (BESSON e DICKENSON, 1997).

A dor como uma sensação desagradável e de complexa percepção, ocorre desde um pequeno desconforto até um processo destrutivo, com graves danos aos tecidos, sendo expressa por reação orgânica e emocional. No entanto, a melhor definição para dor foi determinada pela IASP - Associação Internacional para Estudo da Dor, definindo-a como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada o dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termo de tal lesão (MELZAC & LOESER, 1999; RAINVILLE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2004).

1.4.1. Tipos de Dor

É evidente que a dor produzida por estímulo lesivo funciona como um alerta, mas, quando ela permanece por um longo tempo, passa a produzir grande sofrimento ao organismo, muitas vezes desnecessário. Do ponto de vista temporal, pode-se classificar a dor em aguda, que é aquela de duração curta, e que serve como alerta, e a crônica, demorada, que quase sempre denota um estado patológico.

Outros tipos de dor possíveis de serem citadas são (RANG *et al.*, 2003):

- 1) Nociceptiva – ocorre quando existe um traumatismo nos receptores nociceptivos, devido a alterações na sua estrutura anátomo-funcional com liberação de substâncias algogênicas nos tecidos.
- 2) Neurogênica – é aquela que ocorre com o dano diretamente sobre as inervações.
- 3) Neuropática – resultante do processamento somatossensorial anormal ao nível periférico ou central, como, por exemplo, a dor do membro fantasma.
- 4) Inflamatória – caracterizada pela sensibilização dos neurônios produzida pela ativação da cascata de citocinas, as quais são substâncias de natureza peptídica, liberadas no tecido inflamatório e de células do sistema imunobiológico.

5) Dor psicogênica – é aquela que não possui causa orgânica, mas se expressa em conseqüências de problemas psicológicos (MENEZES, 1999).

1.4.2. Mecanismo da Dor

A transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas centrais e periféricas desde a pele, vísceras ou outros tecidos até o córtex cerebral (FURST, 1999). Os estímulos nocivos tais como calor, frio, compressão intensa ou substâncias químicas endógenas ou exógenas potencialmente nocivas, ativam as terminações nervosas livres e periféricas de fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A δ , chamadas de nociceptores.

Existem nociceptores para os diferentes estímulos, como exemplos, têm-se: A sensibilização dos nociceptores ocorrida em casos de mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), hipóxia ou lesão tecidual seguida de inflamação (estímulo nocivo químico), resultam na liberação local de mediadores químicos tais como bradicinina, prótons, serotonina, histamina, metabólitos do ácido araquidônico, ATP, adenosina, citocinas, aminoácidos excitatórios, Substância P, NO, Neuropeptídeo Y, colecistocinina (CCK), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), opióides, somatostatina, acetilcolina entre outros (JULIUS e BASBAUM, 2001; GRIFFIS *et al.*, 2006).

Existem ainda os chamados nociceptores silenciosos (“silent” ou “sleeping”), que são uma pequena proporção das fibras aferentes, os quais normalmente não são responsivos a estímulos. Entretanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios, ou após a administração de agentes flogísticos, apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais (JULIUS & BASBAUM, 2001).

A estimulação dos nociceptores periféricos faz com que a informação nociceptiva seja levada através das fibras aferentes ao SNC. 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).

Quando um objeto perfurante pressiona a pele sem feri-la é possível sentir uma dor aguda e localizada, mas quando esse objeto a lesa, a sua retirada não impede que a pessoa sinta um segundo tipo de dor que dura algum tempo, tanto mais prolongada quanto maior for o ferimento. O primeiro tipo de dor que ocorreu se chama dor rápida ou dor aguda, enquanto que o segundo tipo é chamado de dor lenta ou dor crônica. O que distingue a dor crônica da dor aguda não é apenas a sua duração, mas a incapacidade do sistema nervoso em restabelecer a atividade neuronal em níveis homeostáticos. A característica da dor rápida consiste na ativação de maior quantidade de terminações livres das fibras A δ , que são fibras pouco mielinizadas, de médio diâmetro (2-6 μ m de diâmetro), representando assim a dor pungente, aguda e passageira, que aparece logo após a lesão tecidual. A ação lesiva no tecido provocada por uma agulha, por exemplo, e por substâncias químicas liberadas após a lesão ativam ou sensibilizam os nociceptores constituídos por fibras livres do tipo C que se caracterizam por serem não mielinizadas de pequeno diâmetro (0,4-1,2 μ m), medeiam a dor lenta, uma dor mais latente e difusa, que se perpetua por mais tempo (JULIUS e BASBAUM, 2001; CRAIG, 2003).

Estas fibras podem ser chamadas de polimodais, pois, conforme descrito acima, respondem a estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos. Dessa forma, apresentam receptores termo sensíveis ao calor e ao frio, bem como receptores específicos para substâncias algogênicas (HUNT e MANTYH, 2001; IKEDA *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2004; COUTAUX *et al.*, 2005). Assim, tornam-se importantes para se avaliar a atividade nociceptiva, através, por exemplo, dos seguintes métodos: estimulação química (i.e. substâncias irritantes como ácido acético e formalina); estimulação térmica por calor ou frio intenso (i.e. teste da placa-quente) e estimulação mecânica (i.e. pressão da cauda).

A simples sensibilização dos nociceptores provoca uma leve despolarização do seu potencial de repouso aproximando do limiar de disparo de potenciais de ação. Isto faz com que um leve estímulo que, normalmente, não produziria dor, passe a fazê-la. A este fenômeno dá-se o nome de hiperalgia (LENT, 2004). Quando um instrumento perfuro-cortante lesa a pele, naturalmente

provoca sangramento, pois rompe vasos que irrigam o tecido, ocorrendo a anóxia nesta região, conseqüentemente têm-se lesão celular e o aparecimento do processo inflamatório logo após. A inflamação, conforme já descrito, costuma ser dividida em duas fases: inflamação aguda e a inflamação crônica. A inflamação aguda se refere à resposta inicial; a lesão tecidual é mediada pela liberação de autacóides também chamados de hormônios locais que são substâncias produzidas no próprio local da inflamação, que precede o desenvolvimento da resposta imune (FURST & MUNSTER, 2003).

Durante a lesão, há a liberação de eritrócitos, plaquetas e leucócitos. Dentre, os leucócitos, encontram-se os mastócitos que são células produtoras e secretoras de substâncias algogênicas: a serotonina, a histamina, as células lesadas também produzem a bradicinina (um peptídeo fortemente algogênico) e substâncias irritantes como os autacóides (prostaglandinas, prostaciclina e outros metabólitos produzidos na cascata do ácido araquidônico).

Com a despolarização dos nociceptores, há a produção, pelas próprias terminações nervosas, de prostaglandinas e de neuropeptídeos, a exemplo da substância P e do peptídeo CGRP, os quais provocam vasodilatação local, eritema, com o prolongamento da dor e também causando edema. Essas ações provocam a reação inflamatória neurogênica (Figura 3).

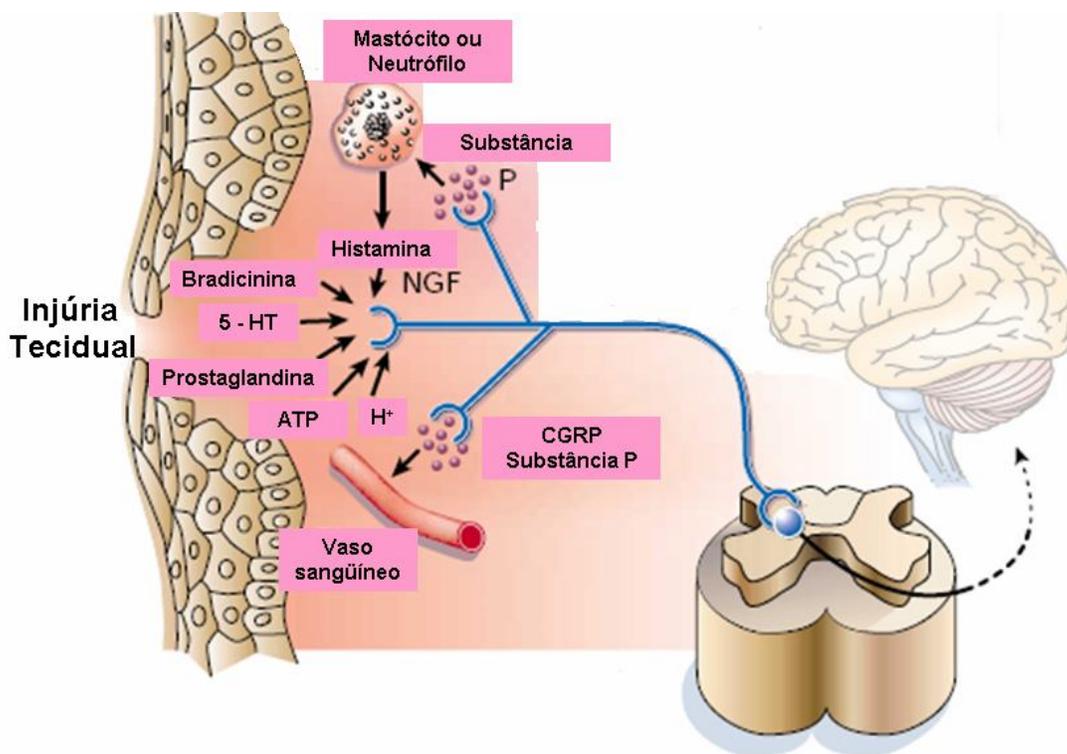


Figura 3. Mecanismo geral da dor. A figura representa os principais mediadores liberados que são capazes de sensibilizar os nociceptores (Fibras A δ e C) Modificado de Julius & Basbaum, 2001.

Assim, a dor tem levado ao descobrimento de múltiplos mediadores envolvidos neste processo, além de um extraordinário progresso no entendimento dos mecanismos de ação dos neurotransmissores e drogas envolvidas na sua modulação central e periférica (LEVINE & TAIWO, 1994; WOOD & DOCHERTY, 1997; MILLAN, 1999). Neste sentido, muitos esforços têm sido dedicados, buscando compreender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na origem da dor.

Neste contexto, substâncias capazes de diminuir a condição inflamatória podem ser empregadas no tratamento contra a dor, com o intuito de inibir a produção de mediadores inflamatórios, ou ainda, no bloqueio das atividades das fibras aferentes, como os bloqueadores dos canais iônicos. Na verdade, a grande maioria dos fármacos presentes no mercado que são utilizados para o controle da dor, possuem um cunho antiinflamatório (MENDELL & SAHENK, 2003). As drogas antiinflamatórias não esteróides (DAINES) constituem um bom exemplo

do inacabado cenário da busca pelo analgésico ideal. As drogas inibidoras da COX-2, de cunho mais específica, ainda não têm mostrado efeitos satisfatórios devido aos seus efeitos colaterais, como ação citotóxica direta, além do risco potencial de problemas cardiovasculares (MUCKHERJEE, 2002; TOMISATO *et al.*, 2004). Mais recentemente, tem-se investigado a utilização clínica de DAINES combinados com opióides (MIRANDA *et al.*, 2005) ou óxido nítrico (MILLER & MEGSON, 2007). Além disso, as descobertas sobre a COX-3 abrem uma nova perspectiva de explicação dos mecanismos centrais de inibidores da dor e febre (CHANDRASEKHRAN, 2002).

1.5. Relevância e justificativa

O estudo dos mecanismos e dos mediadores envolvidos no processo inflamatório vem sendo alvo de inúmeras pesquisas ao longo dos últimos anos. Assim, o estudo de substâncias naturais que possam interferir neste complexo processo biológico é de extrema relevância.

Vale ressaltar que a pesquisa de atividades biológicas, seja no processo inflamatório e/ou analgésico, com lectinas de algas vermelhas é algo novo, onde, somente nos últimos anos vem se desenvolvendo.

Nesse contexto, em função do interesse crescente pelo estudo das lectinas, somado aos dados da literatura, que mostram seus efeitos sobre os eventos celulares e vasculares do processo inflamatório com envolvimento de vários mediadores, este estudo pode sugerir uma aplicabilidade biotecnológica para lectinas na construção de medicamentos alternativos com propriedades antiinflamatórias para várias condições fisiológicas e patológicas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a atividade antiinflamatória e antinociceptiva da lectina obtida da alga vermelha *Hypnea cervicornis* (HCA) em modelos experimentais de inflamação e dor.

2.2. Específicos

- Avaliar a atividade da HCA sobre a migração de neutrófilos induzida por estímulo inflamatório indireto (carragenina) e direto (fMLP);
- Estudar o efeito da HCA sobre o edema de pata induzido por carragenina e dextrana;
- Investigar o envolvimento do domínio lectínico no possível efeito da HCA nos modelos utilizados;
- Avaliar a importância da estrutura tridimensional da lectina na possível efetuação da resposta antiinflamatória;
- Avaliar o efeito da HCA sobre o rolamento e adesão dos leucócitos no endotélio vascular;
- Estudar a participação do óxido nítrico na possível atividade antiinflamatória da lectina;
- Estudar o efeito da HCA na liberação de substâncias quimiotáticas através da dosagem de citocinas pró-inflamatórias;
- Investigar um possível efeito antiinflamatório direto da HCA sobre os neutrófilos através do modelo de quimiotaxia *in vitro*;
- Avaliar atividade antinociceptiva da HCA em modelos experimentais de estímulos químicos (ácido acético, formalina) e térmico (placa quente);
- Investigar a atividade da HCA no modelo de rota rod;

- Avaliar efeitos sistêmicos do tratamento com a HCA através dos seguintes parâmetros: leucograma, massa corpórea, aspectos macroscópicos de órgãos vitais, função renal, função hepática e pressão arterial.

Materials

3. MATERIAIS

3.1. Lectina

Espécies de *Hypnea cervicornis* J. Agardh (Rhodophyta, Gigartinales, Hypneaceae) foram coletadas na praia do Pacheco na costa Atlântica do Estado do Ceará e identificadas por critérios já estabelecidos (TAYLOR, 1960; JOLY, 1965), pelos Professores: Alexandre H. Sampaio e Wladimir R. L. Farias no Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará.

Após a coleta o material foi limpo dos epífitos, imediatamente transportado e armazenado a -20°C até o uso.

O isolamento e purificação foram realizados como descrito anteriormente (NAGANO *et al.*, 2005a), através de cromatografia de troca iônica do tipo Sephacel-DEAE e por espectrometria de massa (MALDI-TOF) no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMoLab) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), sob a coordenação do professor Dr. Benildo Sousa Cavada.

3.2. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) machos, pesando entre 25 a 35 gramas, nos experimentos de nocicepção. Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com peso entre 150 a 220 g, nos demais experimentos. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e mantidos no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Todos foram acondicionados em gaiolas apropriadas, sob condições adequadas de luz e temperatura, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos.

Os protocolos utilizados nesse trabalho estarão de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo comitê de ética da Universidade Federal do Ceará.

3.3. Drogas e reagentes

- Ácido acético (PA - Grupo Química Brasil);
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (Merck);
- Ácido sulfúrico (Merck);
- Albumina sérica bovina (Sigma);
- Álcool iodado;
- Aminoguanidina (Sigma);
- Anticorpo biotinilado de interleucina 1 (Dako);
- Anticorpo biotinilado TNF- α (Dako);
- Avidina – horseradish peroxidase (Dako A/S, Denmark);
- Azul de Tripán (Merck);
- 1,2-Fenilenodiamino (Sigma);
- Carragenina (Sigma);
- Dextrana (Sigma);
- Diazepam (Roche);
- Eosina (Reagen);
- Formol (PA – Merck);
- Gradiente de Ficoll Hypaque (Sigma);
- Gradiente de Percoll 65% (Sigma);
- Hematoxilina (Reagen);
- Heparina (ampolas de 5.000 UI/ml; HEPARIN®) (Cristália -Brasil);
- L-Nitro-Arginina (Sigma);
- MIP-2 (Peprtech)
- Mucina (submaxilar bovina) (Sigma);

- N-1-Naftil-etilenodiamino-dihidrocloro 1 % (Sigma);
- N-Formil-Metil-L-Metionil-L-Leucil-L-Fenilalanina (fMLP) (Sigma);
- Dihidrocloro de 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD) (Sigma);
- Peróxido de Hidrogênio (Merk);
- Kits laboratoriais para dosagem: Uréia, Creatinina, AST, ALT. (LABTEST®);
- Solução Salina – Cloreto de sódio estéril a 0,9% (Pharmace);
- Solução de Turk (Ácido acético e violeta de genciana-Isofar)
- Soro de cabra (Peptotec);
- Soro de carneiro (Peptotec);
- Sulfanilamida (Sigma);
- Sulfato de morfina (Cristália-Brasil);
- Tribromo etanol (Sigma);
- Tween 80 (Merck);

3.4. Equipamentos e materiais

- Agitador para tubos de ensaio mod. TE089 (MARCON);
- Agitador magnético Thermolyne, mod M37510/26
- Balança para pesagem dos animais, modelo ID-1500 (FILIZOLA);
- Balança analítica, digital modelo 260 (MARTE);
- Banho -maria modelo 100 (FANEN);
- Câmaras de Boyden;
- Câmara de Neubauer;
- Cânulas de polietileno (PE 50);
- Citocentrífuga mod. 248 (FANEM);
- Estufa de CO₂;

- Membrana de policarbonato (5 μ m Milipore Corp., Bedford, MA);
- Microcâmara de 48 poços (NEUROPROBE Inc. CABIN JOHN, MD);
- Rota Rod (insight)-Brasil;
- Microscópio óptico binocular;
- Pletismômetro Hugo Basile (7140);
- Power Lab/8sp, AD Instruments[®];

Métodos

4. MÉTODOS

4.1. Estudo da atividade antiinflamatória

4.1.1. Avaliação do efeito da HCA sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por agente quimiotático indireto (Cg) e direto (fMLP)

Os animais (ratos Wistar machos) receberam por via intraperitoneal (i.p.) os estímulos inflamatórios: Cg (500 µg/cavidade) ou fMLP (500 nmol) dissolvidos em 1 mL de salina estéril. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas (h) após. Para tanto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através da lavagem desta injetando-se 10 mL de salina contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão foram coletados cerca de 7 mL de fluido peritoneal, com pipeta Pasteur de plástico.

As contagens total e diferencial dos leucócitos foram realizadas conforme metodologia descrita anteriormente por Souza & Ferreira (1985). Neste procedimento, 20 µL do fluido coletado de cada animal foram diluídos em 380 µL do reagente de Turk e posteriormente usados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada através de esfregaços corados em lâminas. Para tanto, 50 µL do exsudato foram centrifugados em citocentrífuga a 400 x g, durante 10 min, após este processo os esfregaços foram corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE) e as células contadas através de microscopia óptica sendo os resultados expressos como a média ± E.P.M. do número de células x 10³/mL de fluido peritoneal.

A HCA (10⁻², 10⁻¹, 1 e 10 mg/Kg) foi administrada por via endovenosa (e.v.), 30 minutos antes da injeção dos agentes inflamatórios. Para controle negativo do experimento foram utilizados ratos que receberam salina estéril e.v. e i.p. Dexametasona (1 mg/Kg; s.c.) foi utilizada como antiinflamatório de referência, sendo injetada uma hora antes da Cg.

4.1.1.1. Avaliação da participação do sítio de ligação à mucina da lectina de *Hypnea cervicornis* sobre a migração de neutrófilos

A administração da HCA associada à mucina (glicoproteína ligante), neste modelo e nos próximos a serem descritos, teve como objetivo investigar o envolvimento do domínio lectínico nos efeitos da HCA. Para tanto, HCA (1 mg/Kg) sozinha ou em solução de mucina (5 mg/mL), foi incubada *overnight* à 37°C e posteriormente administrada e.v. (0,1 mL) 30 min antes da injeção i.p. de Cg (500 µg/cavidade). Os controles experimentais receberam os seguintes tratamentos: salina e.v e Cg i.p. (controle positivo), somente salina i.p. (controle negativo) e solução de mucina e.v. (5 mg/mL; incubada *overnight* à 37°C) e Cg i.p.. A migração de neutrófilos foi avaliada conforme descrito no item 4.1.1.

4.1.1.2. Avaliação da atividade antiinflamatória da lectina de *Hypnea cervicornis* após desnaturação térmica

Para demonstrar a importância da estrutura tridimensional da HCA para sua atividade antiinflamatória foi realizada sua desnaturação. Para tanto, HCA na dose de 1 mg/Kg foi submetida à fervura (100°C) durante 10 min. Em seguida esta foi injetada e.v. nos animais e 30 min após o estímulo (Cg). A migração de neutrófilos foi avaliada conforme o item 4.1.1. e os resultados foram comparados com os obtidos com a lectina não desnaturada.

4.1.1.3. Avaliação do efeito da HCA sobre o rolamento e adesão dos leucócitos induzidos por Cg na microcirculação mesentérica

A avaliação do rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio vascular foi realizada por microscopia intravital (BAEZ, 1969; RHODIN, 1986; FORTES *et al.*, 1991). Camundongos machos receberam HCA na dose de 1 mg/Kg e.v. ou salina, 30 minutos antes do estímulo inflamatório Cg (500 µg; i.p.). Resumidamente, os animais foram anestesiados com injeção i.p. de solução salina contendo 250 mg/kg de tribromo etanol (i.p.). Através de uma incisão lateral

cutânea na cavidade abdominal, o mesentério foi exteriorizado para a observação da microcirculação *in situ*. Os animais foram mantidos sobre uma placa aquecida (37°C), dotada de área transparente, sobre a qual o tecido foi fixado. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução de Ringer-Locke ou salina estéril a 37°C. A placa aquecida foi mantida sobre o “charriot” de um microscópio óptico tri-ocular, ao qual estão acoplados um fototubo, com sistema de lentes ampliadoras superpostas, um monitor de computador e um vídeo que permite a projeção e gravação de imagem com aumento final de 3400 vezes (BAEZ, 1969).

Os vasos selecionados para o estudo foram vênulas pós-capilares com diâmetro variando 10 a 18 μm . Duas horas após o estímulo inflamatório (Cg), foi avaliado o rolamento dos leucócitos e o número destes aderidos ao endotélio durante 5 minutos em uma extensão de 10 μm de vênula. Esta extensão é definida na tela do monitor: 10 μm no tecido correspondem a 3,4 cm na tela (FORTES *et al.*, 1991), portanto os resultados foram expressos em rolamento celular/10 $\mu\text{m}/\text{min}$ e células aderidas/10 μm^2 . Foram considerados os leucócitos que permaneceram aderidos ao endotélio vascular por mais de 30 segundos (GRANGER *et al.*, 1989). Duas determinações numéricas foram feitas por animal, estimando-se o resultado como média de ambos.

4.1.1.4. Estudo do envolvimento do óxido nítrico na atividade antiinflamatória da lectina de *Hypnea cervicornis*

Para verificarmos a participação do óxido nítrico no efeito inibitório da HCA sobre a migração de neutrófilos foram realizadas as seguintes abordagens experimentais:

Dosagem do óxido nítrico (NO) no soro dos animais pré-tratados com HCA

Os animais foram tratados e.v. com salina (controle positivo) ou HCA (1 mg/Kg) e 30 minutos após foi administrado Cg i.p. (500 μg). Quatro horas após a administração da Cg, os animais foram levemente anestesiados com éter etílico, e em seguida amostras de sangue foram coletadas do plexo retro orbital através de

capilares de vidro heparinizados. Após separação por centrifugação do sangue (10 min a 600 xg), o soro foi utilizado para a determinação indireta de NO mensurado pelos níveis de nitrato os quais foram determinados através da conversão de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), pela ação da enzima nitrato-redutase, quantificado pela reação de Griess (CHEN *et al.*, 2000). Para o ensaio, 40 μL de soro foram incubados por 12h com 40 μL de tampão contendo a enzima nitrato redutase em placas de 96 poços. Uma curva padrão de nitrato de sódio (0,78-200 μM) foi processada da mesma forma realizada para as amostras. A dosagem de NO_2^- foi realizada pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess. Para tal, foram adicionados 80 μL do reagente de Griess (1% Sulfanilamida em 1% H_3PO_4 / 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina dihidroclorato/ 1% H_3PO_4 / água destilada, 1:1:1:1) em cada poço da placa. Foi determinada a absorbância em leitor de ELISA em 560 nm. A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão realizada com NaNO_2 e expressa em μM de NO_2^- .

Efeito de inibidores da síntese de NO sobre a inibição da migração de neutrófilos pela HCA

Nessa abordagem, 15 min antes da administração e.v. de HCA (1 mg/Kg) os animais receberam dois inibidores da NOS: L-Nitro-Arginina (L-Nitro; inibidor inespecífico da NOS) ou aminoguanidina (Amino; inibidor seletivo da NOS induzida) ambos nas doses de 50 mg/Kg s.c. Após 30 min da administração de HCA a peritonite foi induzida pela injeção i.p. de Cg (500 μg). Como controles experimentais foram formados os seguintes grupos de animais tratados com: salina e.v. e i.p. (controle negativo), salina e.v. e Cg i.p. (controle positivo), HCA e.v. e Cg i.p. (controle do efeito da HCA) e L-Nitro ou Amino s.c. e Cg i.p. (controle inibidores). A migração de neutrófilos foi avaliada conforme o item 4.1.1.

4.1.1.5. Avaliação do efeito da HCA sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α) no fluido peritoneal

As concentrações de TNF- α e IL-1 foram determinadas por “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) no líquido peritoneal dos animais pré-tratados e.v., 30 min antes da indução da peritonite por Cg (500 μ g/cav.), com salina e HCA (1 mg/Kg). Grupo controle negativo recebeu somente salina i.p. Na 2^a hora após a indução da peritonite o fluido peritoneal foi coletado e estocado a -70 ° C para posterior dosagem das citocinas.

O ensaio para determinação da concentração de TNF- α e IL-1 foi realizado baseado em protocolo já descrito (TAKTAK *et al.*, 1991). Placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 μ L de tampão PBS contendo 2,0 μ g/mL do anticorpo monoclonal (mAb) anti-TNF- α e anti IL-1 (purificado do soro de carneiro; Peprotec). A placa foi incubada durante uma noite a 4°C. Após esse período, a placa foi lavada de 3 a 5 vezes com PBS contendo 0,1% Tween 20 (PBS-T; 200 μ L/poço), e em seguida foi incubada com 50 μ L de solução de bloqueio (1% de albumina bovina) durante 2 h em temperatura ambiente. A placa foi lavada conforme descrito acima e, em seguida adicionou-se as amostras testes (triplicata), colhidas do fluido peritoneal. Concentrações decrescentes de TNF- α e IL-1 (Peprotec) diluída em PBS-Tween (o primeiro ponto da curva-padrão de TNF- α e IL-1 utilizado foi de 2000 e 10 pg/mL, respectivamente; diluído em PBS com 0,5% de BSA). A placa foi novamente coberta e mantida durante 12 horas a 4°C. No terceiro dia, a placa foi lavada por três vezes e adicionados os anticorpos biotinilados anti-TNF- α , anti-IL-1 (1:1000 em solução de lavagem contendo 1% de soro de cabra).

Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lavada e em seguida adicionou-se 50 μ L de uma solução 1:5000 do conjugado avidina-horseradish peroxidase diluída em PBS-T. Após incubação por 30 minutos, a placa foi lavada e incubada com 50 μ L do substrato dihidroclorato de 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD) diluído em tampão e adicionado com 0,4 μ L de H₂O₂ 30% por mL.

Após o desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida pela adição de 75 μ L de solução de H₂SO₄ – 1M. A medida da absorbância foi determinada a 490

nm. Os resultados foram expressos em pg/mL de TNF- α ou IL-1 com base na curva padrão obtida.

4.1.2. Avaliação do efeito da lectina de *Hypnea cervicornis* sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*

A verificação da possível interação direta da HCA com neutrófilos foi feita utilizando o modelo de quimiotaxia em câmara de Boyden (Boyden, 1962). Para tanto, sangue foi coletado de camundongos por punção cardíaca e colocado em tubos estéreis de 5mL contendo EDTA a 2% e mantidos no gelo. Os neutrófilos foram purificados através da utilização de gradiente de Percoll. Em seguida, essas células foram lavadas com solução de Hanks' por 2 vezes. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em meio RPMI. A contagem total das células foi realizada em câmara de Neubauer, a pureza dos neutrófilos em lâminas pela coloração com Panótico e a viabilidade observada por exclusão em azul de tripan.

Após a separação, 1×10^6 neutrófilos/mL foram ressuspensos em meio RPMI/BSA (0,01%) e pré-incubados por 1 hora (37°C/CO₂ 2%) na presença ou não da HCA (125 e 250 μ g/poço). Em seguida, os neutrófilos foram lavados 2 vezes com solução de Hanks' e ressuspensos em 1mL com RPMI/BSA (0,01%). O ensaio de quimiotaxia *in vitro* foi realizado em Câmara de Boyden utilizando como estímulo MIP-2 (10 ng/mL), adicionando-se 28,6 μ L/poço no compartimento inferior da câmara. A suspensão de células (10^6 células/mL) previamente tratadas com a lectina, foi colocada (50 μ L/poço) no compartimento superior. Os dois compartimentos foram separados por uma membrana de policarbonato (5 μ m Milipore Corp., Bedford, MA). A câmara foi incubada (37°C/CO₂ 2%) por 1 hora. No final do período de incubação, o filtro foi removido fixado e corado com HEMA. Os neutrófilos que migraram foram quantificados por microscopia óptica usando-se objetiva de imersão (aumento de 100 X).

A contagem dos neutrófilos foi feita em cinco campos aleatórios, para cada poço, de um total de 6 poços, por grupo experimental. Em cada experimento RPMI foi utilizado como controle negativo (migração randômica) e MIP-2 (10

ng/mL) como controle positivo. A migração foi expressa como o número de neutrófilos por campo.

4.1.3. Avaliação do efeito da HCA sobre o edema de pata induzido por Carragenina e Dextrana

O edema foi avaliado pelos volumes de líquidos deslocados das patas direitas de cada animal pletismograficamente antes da injeção dos estímulos inflamatórios (tempo zero). Em seguida o edema de pata foi induzido por dextrana ou carragenina (Cg). Estas foram injetadas por via subcutânea (s.c.) intraplantar, diluídas em 0,1 mL de solução salina. A avaliação do edema foi feita 1, 2, 3 e 4 h após a administração dos agentes inflamatórios. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pelas patas em um determinado tempo após o estímulo e antes do estímulo (tempo zero). As áreas sob as curvas (ASC) também foram calculadas usando o método do trapézio (LANDUCCI *et al.*, 1995). Os resultados foram expressos em mL e também em unidades arbitrárias (ASC) e comparados àqueles obtidos das patas dos animais injetados com o estímulo inflamatório e também com salina (0,1 mL).

HCA (10^{-1} e 1 mg/Kg) foi administrada e.v em 0,1 mL de salina, 30 minutos antes da Cg (500 µg/ pata) ou dextrana (450 µg/ pata). O grupo controle positivo recebeu salina estéril e.v. enquanto o grupo controle negativo recebeu salina s.c. Dexametasona (1 mg/Kg s.c.) 1 hora antes da Cg, foi utilizada como antiinflamatório padrão. O edema foi avaliado e expresso conforme descrito anteriormente.

4.1.3.1. Participação do sítio de ligação da lectina de *Hypnea cervicornis* sobre o seu efeito anti-edematogênico

HCA (1 mg/Kg) sozinha ou em solução de mucina (5 mg/mL), foi incubada *overnight* à 37°C e posteriormente administrada e.v. (0,1 mL) 30 min antes da injeção intraplantar s.c. de Cg. Os controles experimentais receberam os seguintes tratamentos: salina e.v e Cg s.c. (controle positivo), salina s.c (controle

negativo) e solução de mucina e.v. (5 mg/mL; incubada *overnight* à 37°C) e Cg s.c.. O edema foi avaliado conforme descrito no item 4.1.3.

4.2. Estudo da atividade antinociceptiva

4.2.1. Contorção abdominal induzida por ácido acético

Camundongos em jejum de sólidos por 12 h receberam HCA e.v. nas doses de 10^{-2} , 10^{-1} , 1 e 10 mg/Kg diluídas em salina ou HCA 10^{-1} mg/Kg diluída em solução de mucina (5 mg/mL) incubada *overnight* à 37°C. Grupos controles receberam salina e.v. (controle negativo) ou morfina (5 mg/Kg) s.c. (controle positivo). Após 30 min dos tratamentos citados, os animais receberam por via i.p. solução de ácido acético 0,6% (10 mL/kg) e após 10 minutos o número total de contorções abdominais foi determinado por um período de 20 minutos (KOSTER *et al.*, 1959). Os resultados foram expressos como as médias do número de contorções \pm EPM.

4.2.2. Teste da Formalina

Formalina 1,2% foi administrada na pata traseira direita de camundongos (20 μ L/pata), previamente mantidos em jejum de 12 h. Imediatamente após a administração da formalina o tempo de lambedura ("*licking time*") foi registrado por cerca de 5 min (fase 1, neurogênica) e de 20 à 25 min (fase 2, inflamatória) (HUNSKAAR *et al.*, 1987).

Animais receberam 30 minutos antes da administração da formalina: salina e.v. (controle negativo), sulfato de morfina (5 mg/Kg; controle positivo) e HCA nas doses de 10^{-1} , 1 e 10 mg/Kg e.v. diluídas em salina. Os resultados foram expressos como o tempo de lambedura em segundos \pm E.P.M.

4.2.3. Teste da Placa quente

O método da placa quente consiste em colocar camundongos sobre uma placa aquecida (51 ± 1 °C) e observar quanto tempo os animais levam para manifestar as respostas de saltar e/ou lambem a pata traseira. Sendo este um teste específico de nocicepção de resposta central (EDDY & LEIMBACH, 1953).

Os animais que apresentaram reações ao estímulo térmico, em um intervalo de tempo de até 20 segundos foram selecionados para o teste. Nesse modelo, camundongos receberam salina e.v. (controle negativo), sulfato de morfina (5 mg/Kg) s.c. (controle positivo) e HCA nas doses de 10^{-1} , 1 e 10 mg/Kg e.v. no tempo zero (T0), respectivamente. Após 30 min o tempo de resposta foi avaliado nos tempos de 30 (T30), 60 (T60), 90 (T90), min, com um tempo de corte (“cut-off”) de 45 segundos para evitar lesão na pata do animal. Os resultados foram expressos como o tempo de reação em segundos \pm E.P.M.

4.2.4 Teste do rota rod

Esta abordagem foi feita com o objetivo de verificar uma possível interferência da HCA no sistema locomotor do animal.

Para tanto, os animais foram pré-selecionados 24 horas antes da realização do experimento, ao serem individualmente posicionados no aparelho de rota rod (4 rotações por minuto). Os animais que permaneceram 2 minutos na barra foram selecionados para estudo.

Os animais receberam HCA e.v. nas doses de 1 e 10 mg/Kg ou salina (grupo controle). Diazepam (2 mg/Kg; i.p.) foi utilizado como controle positivo no experimento. Após 30 min das injeções os animais foram colocados na barra, individualmente, e registrado o tempo de permanência no aparelho durante 2 min. Os resultados foram expressos como o tempo (em segundos) de permanência do animal no aparelho \pm E.P.M. (DUNHAM & MYIA, 1957).

4.3. Avaliação de efeitos sistêmicos decorrentes do tratamento endovenoso com a lectina de *Hypnea cervicornis*

4.3.1. Toxicidade sub-crônica

Para avaliação de possíveis efeitos tóxicos da HCA, foram utilizados dois grupos experimentais. Um grupo recebeu uma solução de lectina (1mg/kg) diluída em solução salina durante sete dias por via e.v., obedecendo uma posologia de tomada diária única. O outro grupo recebeu a mesma quantidade de solução salina pela mesma via e posologia.

Após os sete dias, os animais foram pesados e sua massa comparada com a massa anterior (antes do tratamento) e o resultado sendo expresso como variação de massa corpórea antes e após os tratamentos. Em seguida, foi coletado sangue dos animais de ambos os grupos pelo plexo orbital para avaliação do leucograma e dosagens bioquímicas, sendo estes então sacrificados, e seus órgãos (fígado, coração, rim) removidos ainda úmidos e pesados. O peso de cada órgão foi expresso por cada 100g de massa corporal e comparado ao grupo controle. O estômago dos animais foi também removido para avaliação macroscópica da possível presença de úlceras (SANTUCCI *et al.*, 1994)

Na avaliação do leucograma, uma gota de sangue foi colocada sobre lâminas para a confecção de esfregaços, corados pelo método HE, e destinados à contagem diferencial das células em microscópio óptico, utilizando a objetiva de imersão (aumento de 100 vezes). A contagem total foi feita de acordo com o método de Souza & Ferreira (1985). Após este procedimento, obteve-se então o número de células x 10³/ mL de sangue.

O restante da amostra de sangue foi centrifugado, e o plasma removido para realização das dosagens bioquímicas de uréia e creatinina como indicadores de função renal e avaliação da atividade das enzimas AST e ALT, como indicadores da função hepática. Todas as dosagens foram realizadas utilizando “Kits” específicos em aparelhos automatizados pelo laboratório de Bioquímica do Hospital Universitário Walter Cantídio da UFC.

4.3.2 Avaliação da pressão arterial após injeção de *Hypnea cervicornis*

Ratos machos anestesiados com tribromoetanol foram submetidos a canulação da artéria carótida esquerda por uma cânula de polietileno (PE 50), preenchida com solução salina e heparina (500 UI/mL), e mantidos em gaiolas isoladas 24 h antes da avaliação da pressão arterial (PA em mmHg).

Após esse período, os animais receberam e.v. salina (0,1 mL) ou HCA (1 mg/Kg) e 30 min após a cânula da artéria carótida foi conectada a transdutores de pressão (MLT 1050, MLT 0380), acoplados a sistema digital de aquisição de sinais biológicos (PowerLab/8sp, AD Instruments®). Os valores de PA foram determinados a partir dos registros gravados no micro-computador com o auxílio do programa Chart® v 4.0 (AD Instruments®, Austrália) sendo avaliada por 40 min. Os resultados foram expressos como PA em mmHg \pm E.P.M. a cada 10 min.

4.4. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni.

Os resultados da atividade antinociceptiva foram realizados pelo teste-t Student – Neuman – Keuls. Para todas as análises foi considerado significativo $p < 0,05$.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Estudo da atividade antiinflamatória

5.1.1. A lectina de *Hypnea cervicornis* reduz de forma dose-dependente a migração de neutrófilos induzida por carragenina em ratos

A injeção e.v. da HCA, 30 min antes do estímulo (Cg), foi capaz de inibir, de forma dose-dependente, a migração de neutrófilos nas doses de 10^{-1} , 1 e 10 mg/Kg após a 4ª hora da administração i.p. de Cg (500µg) no modelo de peritonite. Essa inibição foi de 55, 81 e 90%, respectivamente. Dexametasona (Dexa), corticóide utilizado como droga de referência, reduziu significativamente a migração de neutrófilos em 75%. O grupo controle positivo (Cg) produziu um aumento significativo no número de neutrófilos, comparados ao grupo salina. (Figura 4).

5.1.2. A associação da HCA ao seu ligante específico (Mucina) bloqueia seu efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos

A administração i.p. de carragenina (500 µg; Cg), induziu de forma significativa ($p < 0,05$) uma intensa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, quando comparado ao grupo Salina nos quais os animais foram tratados somente com salina i.p. A migração foi inibida em 81% nos animais tratados e.v. com HCA (1 mg/Kg), 30 minutos antes da aplicação do estímulo inflamatório. Por outro lado, a associação da lectina ao seu ligante específico mucina, nas condições de incubação já descritas, bloqueou completamente o efeito provocado pela HCA neste modelo. Somente mucina administrada e.v., não foi capaz de causar redução significativa do número de neutrófilos. (Figura 5).

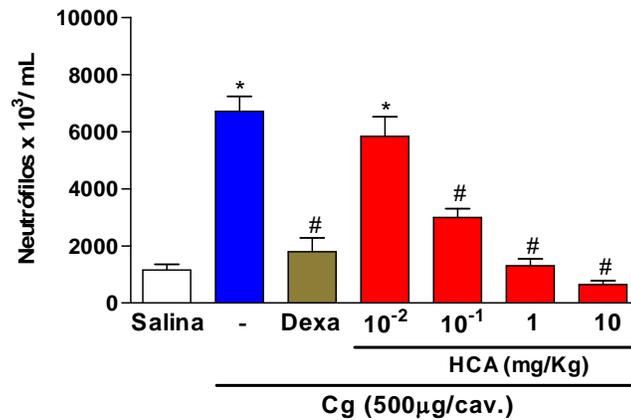


Figura 4 – Lectina de *Hypnea cervicornis* reduz de forma dose-dependente a migração de neutrófilos (MN) induzida por carragenina em ratos. Os animais foram tratados com HCA (10^{-2} , 10^{-1} , 1 e 10 mg/Kg; e.v.) ou dexametasona (1 m/Kg; s.c.; Dexa) 30 min ou 1 h antes da Cg (500 μ g; i.p.). A MN foi avaliada 4 horas após a Cg. O grupo controle positivo (-) recebeu Cg i.p. e salina e.v.; controle negativo (Salina) salina i.p. As barras representam a média do número de neutrófilos \pm E.P.M. de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Salina e # comparado com o grupo Cg. (ANOVA, teste de Bonferroni).

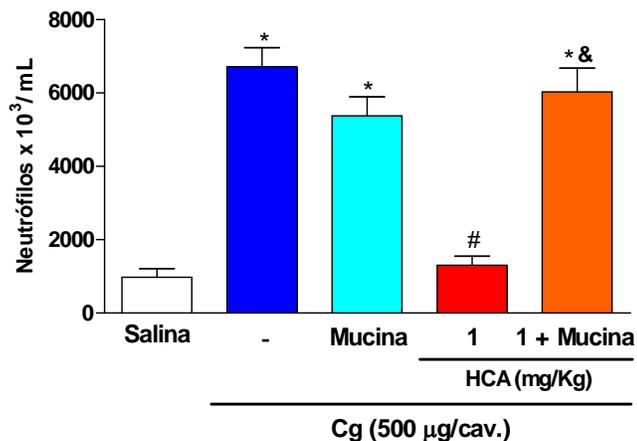


Figura 5 – Associação da HCA ao seu ligante específico (Mucina) bloqueia seu efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos (MN) para a cavidade peritoneal de ratos. Os animais receberam HCA (1 mg/Kg) sozinha ou em solução de mucina, 30 minutos antes da injeção de Cg. O grupo controle positivo (Cg) recebeu salina e.v. e o grupo mucina recebeu somente solução de mucina e.v. (1 mg/Kg). A MN foi avaliada 4 horas após a Cg. As barras representam a média do número de neutrófilos \pm E.P.M. de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo Salina, # comparado ao grupo Cg e & ao grupo tratado com HCA sozinha. (ANOVA, teste de Bonferroni).

5.1.3. A desnaturação térmica da lectina de *Hypnea cervicornis* inibe sua atividade antiinflamatória no modelo de peritonite induzida por carragenina em ratos

A exposição da lectina de *Hypnea cervicornis* (HCA; 1 mg/Kg) ao tratamento térmico (100°C/10min) aboliu completamente o seu efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos. Conforme já demonstrado, HCA (1 mg/Kg; e.v.) diminuiu em 74% a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Enquanto que, a administração i.p. de carragenina (500 µg), induziu de forma significativa uma intensa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, quando comparado ao grupo Salina, nos quais os animais foram tratados somente com salina i.p. (Figura 6).

5.1.4. Lectina de *Hypnea cervicornis* apresenta atividade antiinflamatória de forma dose-dependente no modelo de peritonite induzida por fMLP em ratos

A lectina de *Hypnea cervicornis* inibiu a migração de neutrófilos de forma significativa no modelo de peritonite induzida por fMLP, nas doses de 10^{-1} , 1 e 10 mg/Kg após a 4ª hora da administração i.p. de fMLP (500 nmol). Essa inibição foi de 71, 78 e 83%, respectivamente. O grupo controle positivo (fMLP) produziu um aumento significativo no número de neutrófilos, comparados ao grupo Salina. (Figura 7).

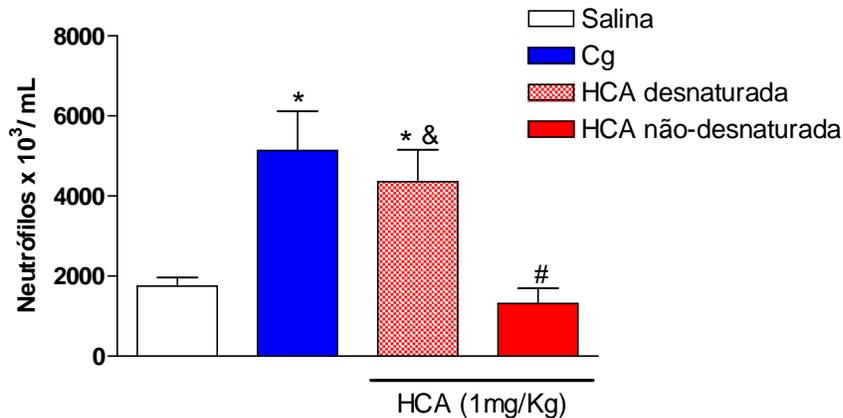


Figura 6 – Desnaturação térmica da HCA inibe sua atividade antiinflamatória no modelo de peritonite em ratos. Os animais receberam HCA (1 mg/Kg e.v.), desnaturada (100°C/10 min) ou não, 30 min antes da injeção i.p. de Cg (500 µg/cav). O grupo controle positivo (Cg) recebeu Cg i.p. e salina e.v. e o controle negativo (Salina) salina i.p. As barras representam a média do número de neutrófilos ± E.P.M. de 6 animais por grupo. * p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Salina, # comparado ao grupo Cg e & ao grupo tratado somente com HCA não-desnaturada. (ANOVA, teste de Bonferroni).

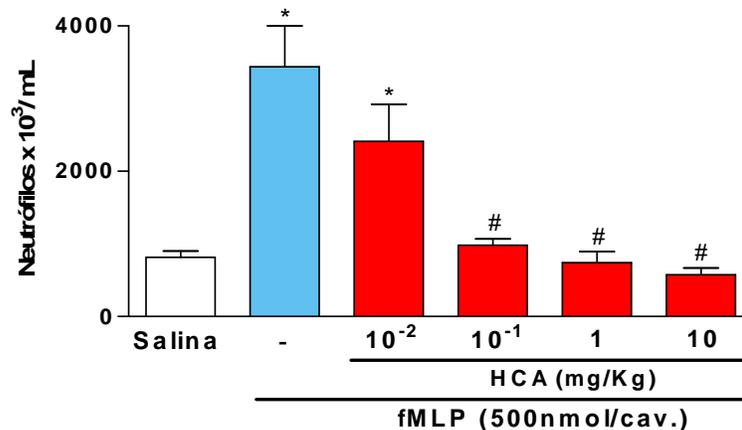


Figura 7 – HCA reduz a migração de neutrófilos induzida por fMLP em ratos de forma dose-dependente. Os animais foram tratados com HCA (10⁻², 10⁻¹, 1 e 10 mg/Kg; e.v) 30 min antes do fMLP i.p. (500 nmol). O grupo controle positivo (-) recebeu fMLP i.p. e salina e.v.; o controle negativo (Salina) somente salina i.p. As barras representam a média do n° de neutrófilos ± E.P.M. de 6 animais/ grupo * p<0,05 indica diferença estatística comparado com o grupo Salina e # com o grupo fMLP. (ANOVA, teste de Bonferroni).

5.1.5. Lectina de *Hypnea cervicornis* diminui o rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos

Após 2h a injeção a Cg (500 µg; i.p.) induziu um significativo aumento no rolamento e na adesão dos leucócitos ao endotélio, quando comparada aos animais que receberam somente Salina. O pré-tratamento dos animais com HCA (1 mg/kg; e.v.) promoveu uma significativa diminuição, tanto no rolamento (83%), quanto na adesão (72%) dos leucócitos avaliados 2h após o estímulo (Figura 8).

5.1.6. O tratamento com HCA aumenta os níveis sanguíneos de óxido nítrico em ratos

A lectina de *Hypnea cervicornis* induziu um aumento significativo (100 %) nos níveis de nitrito na 4ª hora após sua injeção, em soro de animais com peritonite induzida por Cg, quando comparado ao grupo que recebeu somente salina. A administração de carragenina não modificou os níveis de nitrito em relação ao grupo tratado com salina (Figura 9).

5.1.7. A atividade antiinflamatória da lectina de *Hypnea cervicornis* depende da produção de óxido nítrico: aminoguanidina e L-Nitro-Arginina reverterem sua atividade

Aminoguanidina e L-Nitro-Arginina foram capazes de inibir em 47% e 40%, respectivamente, e de forma significativa, a atividade antiinflamatória da HCA quando comparada ao grupo que recebeu a lectina sem um inibidor da síntese de NO. Tanto aminoguanidina quanto L-nitro-arginina quando administradas sozinhas, potencializaram de forma significativa a migração de neutrófilos induzida por carragenina (Figura 10).

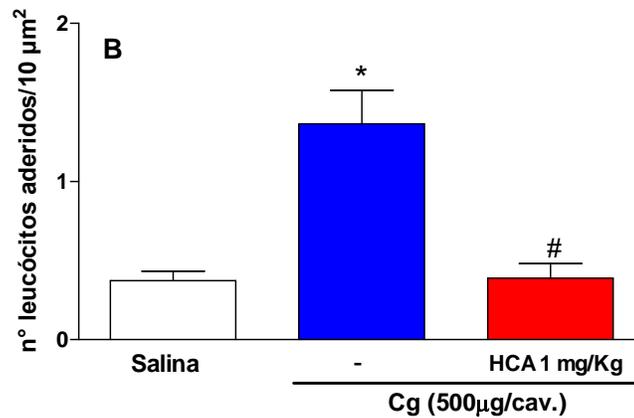
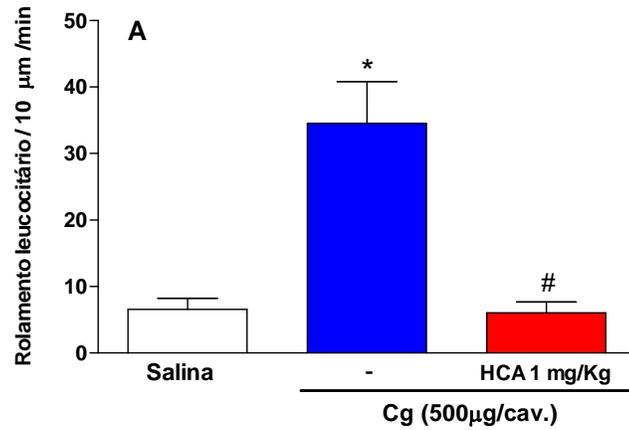


Figura 8 – Lectina de *Hypnea cervicornis* diminui o rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos. Os animais foram tratados com HCA (1 mg/Kg; e.v.) 30 min antes do estímulo (Cg; 500 µg/cav). O rolamento (painel A) e a adesão (painel B) leucocitária foram avaliados por microscopia intravital no mesentério 2h, após injeção de Cg ou Salina i.p. Os valores representam média ± E.P.M. de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Salina e # comparado com o grupo Cg. (ANOVA, teste de Bonferroni).

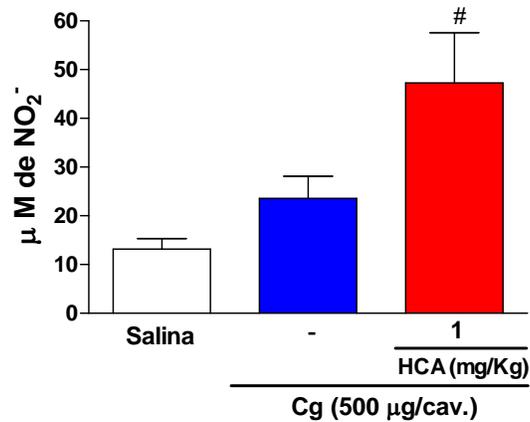


Figura 9 – Lectina de *Hypnea cervicornis* induz aumento de NO no sangue de ratos. Os animais foram tratados e.v. com HCA (1,0 mg/Kg) ou salina (-) 30 min antes da Cg i.p. (500 µg/cav.). O controle negativo (Salina) recebeu somente salina i.p. Após 4 horas da Cg, o soro dos animais foi coletado para dosagem de óxido nítrico (NO) através da reação de Griess. As barras representam a média da concentração de nitrito em µM ± E.P.M. de 6 animais por grupo. # p<0,05 comparado com o grupo Salina e Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).

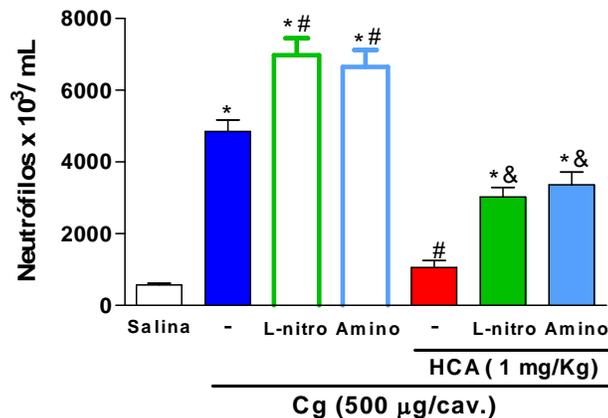


Figura 10 – Aminoguanidina e L-nitro revertem o efeito antiinflamatório da lectina de *Hypnea cervicornis* no modelo de peritonite induzida por Cg em ratos. Os animais foram tratados com salina (0,5 mL s.c.; Cg), L-Nitro-Arginina (50 mg/Kg s.c.; L-Nitro) ou Aminoguanidina (50 mg/Kg s.c.; Amino) 15 min antes da administração da HCA (1 mg/Kg e.v.). Após 30 min da injeção de HCA a Cg (500 µg/cav.) foi administrada i.p. O controle negativo (Salina) recebeu salina i.p. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a Cg. As barras representam a média do número de neutrófilos ± E.P.M. de 6 animais por grupo. * p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Salina, # comparado ao grupo Cg e & ao grupo tratado somente com HCA. (ANOVA, teste de Bonferroni).

5.1.8. A lectina isolada de *Hypnea cervicornis* não interfere nos níveis das citocinas TNF- α e IL-1 no fluido peritoneal de ratos estimulados com carragenina

O agente inflamatório (Cg), quando administrada i.p., induziu um aumento significativo ($p < 0,01$) nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1), quando comparados ao grupo que recebeu somente salina. O pré-tratamento endovenoso com a HCA na dose de 1 mg/Kg não foi capaz de promover diminuição nos níveis destas citocinas no fluido peritoneal (Figura 11).

5.1.9. Lectina de *Hypnea cervicornis* não altera a quimiotaxia *in vitro* induzida por MIP-2

MIP-2 na concentração de 9,0 η g/mL foi efetiva em induzir de forma significativa a quimiotaxia em câmara de Boyden, Entretanto, a pré-incubação dos neutrófilos com a HCA em nenhuma das concentrações testadas (125 e 250 μ g/mL), foi capaz de inibir a a quimiotaxia induzida por MIP-2 . RPMI foi utilizado como controle negativo (Figura 12).

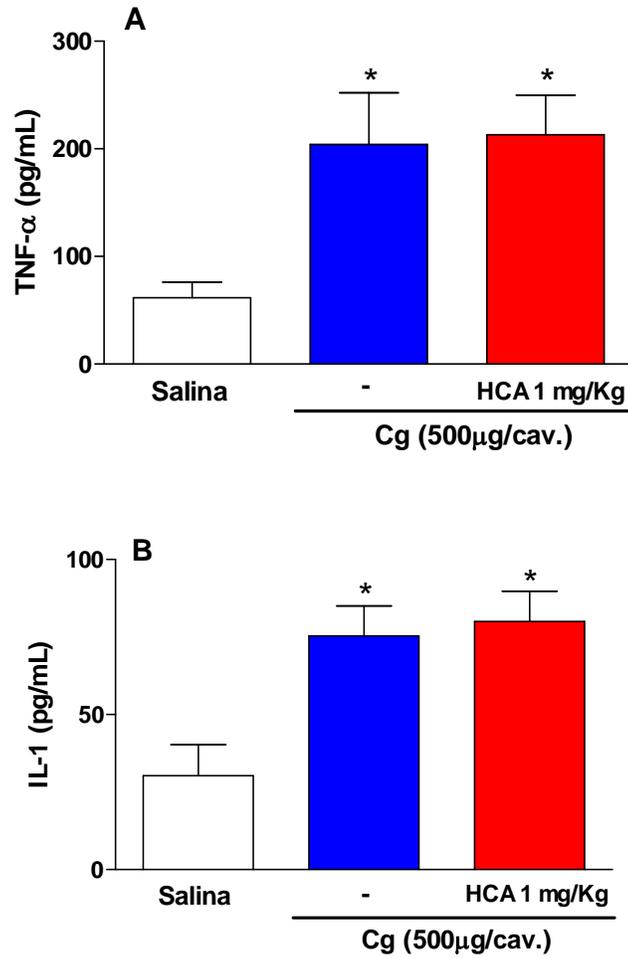


Figura 11 – Lectina de *Hypnea cervicornis* não altera os níveis de TNF- α e IL-1 no fluido peritoneal de animais no modelo de peritonite induzida por carragenina. Os animais foram tratados com HCA (1 mg/Kg; e.v.) ou salina 30 min antes do estímulo (Cg; 500 μ g/cavidade). As dosagens das citocinas foram feitas no exsudato peritoneal coletado 2h após a injeção da Cg. Painei A: níveis de TNF- α . Painei B: Níveis de IL-1. As barras representam média \pm E.P.M. de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Salina. (ANOVA, teste de Bonferroni).

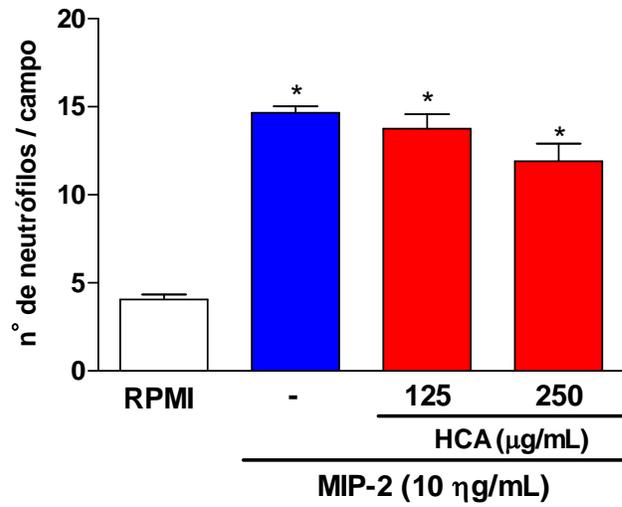


Figura 12 – Lectina de *Hypnea cervicornis* não inibe a quimiotaxia de neutrófilos induzida por MIP-2 *in vitro*. MIP-2 foi utilizada como utilizadas como agente quimiotáticos em microcâmaras de 48 poços. Os neutrófilos foram incubados com HCA (125 e 250 μg/mL) 30 min antes da adição de MIP-2. As barras representam a média ± E.P.M. do número de neutrófilos por campo de um total de cinco campos por poço (6 poços por grupo). RPMI foi utilizado como controles negativo. *p< 0,05 comparado ao grupo RPMI. (ANOVA, teste de Bonferroni).

5.1.10. A lectina de *Hypnea cervicornis* inibe o edema de pata induzido por carragenina em ratos

Animais que receberam injeção intraplantar s.c. de Cg (500µg/pata) apresentaram intenso edema, a partir da 1ª hora seguido de um pico na 3ª hora ($p<0,001$) comparado ao grupo salina. Somente na dose de 1 mg/Kg, HCA foi capaz de inibir significativamente ($p<0,01$) o edema induzido por Cg. Essa redução foi mais eficiente na 3ª hora após o estímulo (72%). Dexametasona, um corticóide utilizado como droga de referência, também apresentou uma redução significativa (64%) do edema induzido por Cg. (Figura 13).

5.1.11. A associação da HCA ao seu ligante específico inibe sua atividade antiedematogênica em ratos

A administração s.c. de Cg (500 µg/pata) induziu de forma significativa um intenso edema, principalmente na 3ª hora quando comparado ao grupo salina ($p<0,05$). Esse edema foi inibido 72% pelo tratamento dos animais 30 min antes do estímulo com HCA (1,0 mg/Kg; e.v.).

O efeito antiedematogênico da HCA foi totalmente bloqueado quando esta foi administrada e.v. em solução incubada à 37°C *overnight* contendo seu ligante específico Mucina. Em acréscimo, a Mucina, administrada sozinha, 30 min antes da Cg não apresentou nenhum efeito sobre o desenvolvimento do edema induzido pela Cg. (Figura 14).

5.1.12. A lectina de *Hypnea cervicornis* não reduz a atividade edematogênica induzida por dextrana

A injeção intraplantar de dextrana (450 µg/pata) em ratos foi capaz de produzir um intenso edema, comparado ao grupo salina, principalmente na primeira hora após a aplicação ($p<0,001$). O tratamento dos animais 30 min antes da administração de dextrana com a lectina de *Hypnea cervicornis* nas doses de 10^{-1} e 1 mg/Kg e.v. não foram capazes de inibir a formação de edema (Figura 15).

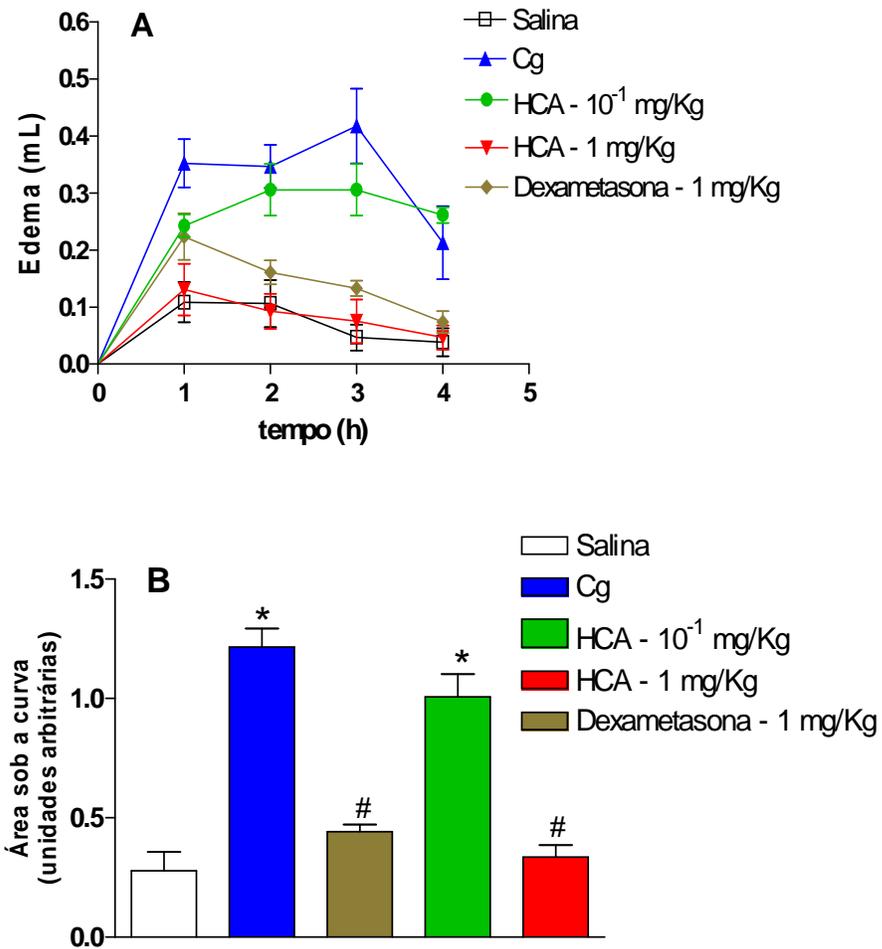


Figura 13 – A lectina de *Hypnea cervicornis* reduz a atividade edematogênica induzida por carragenina. Os animais foram pré-tratados com HCA (10⁻¹ e 1 mg/Kg; e.v.) 30 minutos ou 1 h com dexametasona (1 mg/Kg; s.c.) antes da injeção de Cg (500 µg/pata). O grupo controle recebeu 0,1 mL s.c. de salina. No painel A, as curvas representam a variação do volume das patas (mL) ± E.P.M. O painel B representa as médias da área sob a curva ± E.P.M. de cada grupo. * p<0,05 indica a diferença estatística significativa, comparado com o grupo tratado somente com Salina e # ao grupo que recebeu Cg. (n=6) (ANOVA, teste de Bonferroni).

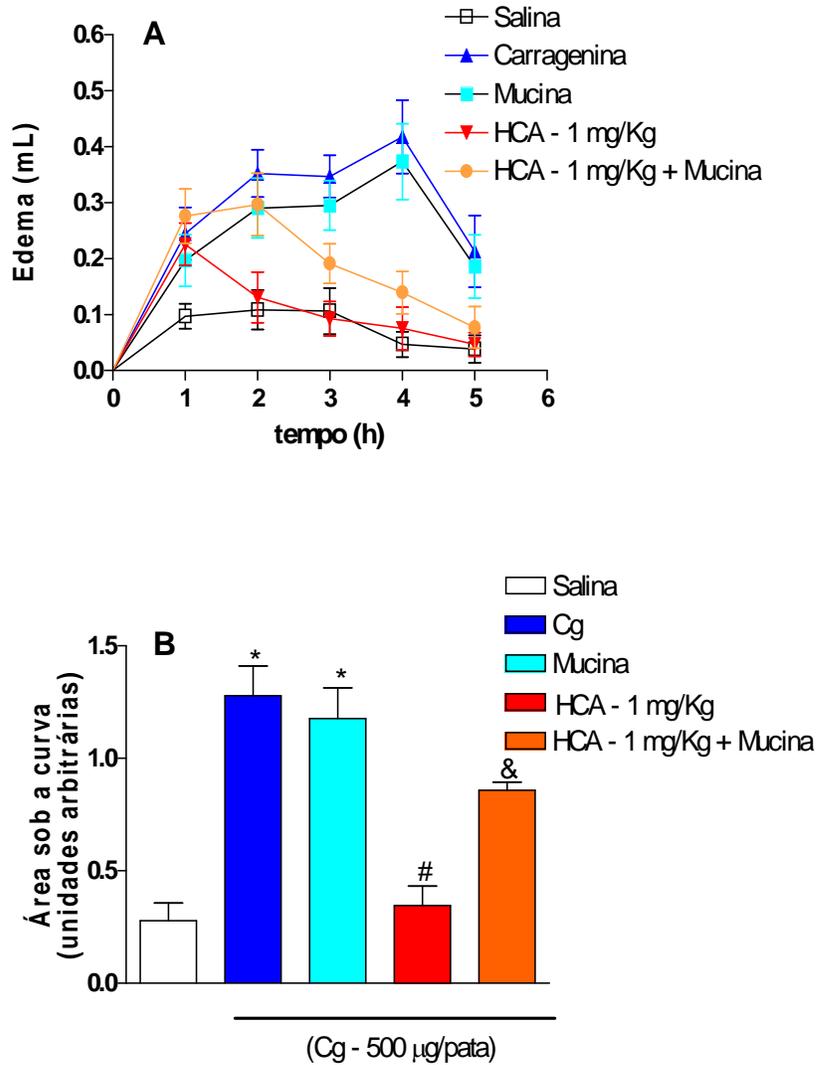


Figura 14 – A atividade antiedematogênica da lectina de *Hypnea cervicornis* é revertida pela associação ao seu ligante específico mucina. Os animais foram tratados e.v. com HCA (1 mg/Kg) ou HCA (1 mg/Kg) associada ao seu ligante específico mucina ou somente mucina (1 mg/Kg) 30 minutos antes da injeção de Cg (500 µg/pata). O grupo controle recebeu 0,1 mL s.c. de salina. No painel A, as curvas representam a variação do volume das patas (mL) ± E.P.M. O painel B representa as médias da área sob a curva ± E.P.M. de cada grupo. * p<0,05 indica diferença estatística significativa comparada com o grupo tratado somente com Salina, # ao grupo que recebeu somente Cg e & ao grupo HCA sozinha. (n=6) (ANOVA, teste de Bonferroni).

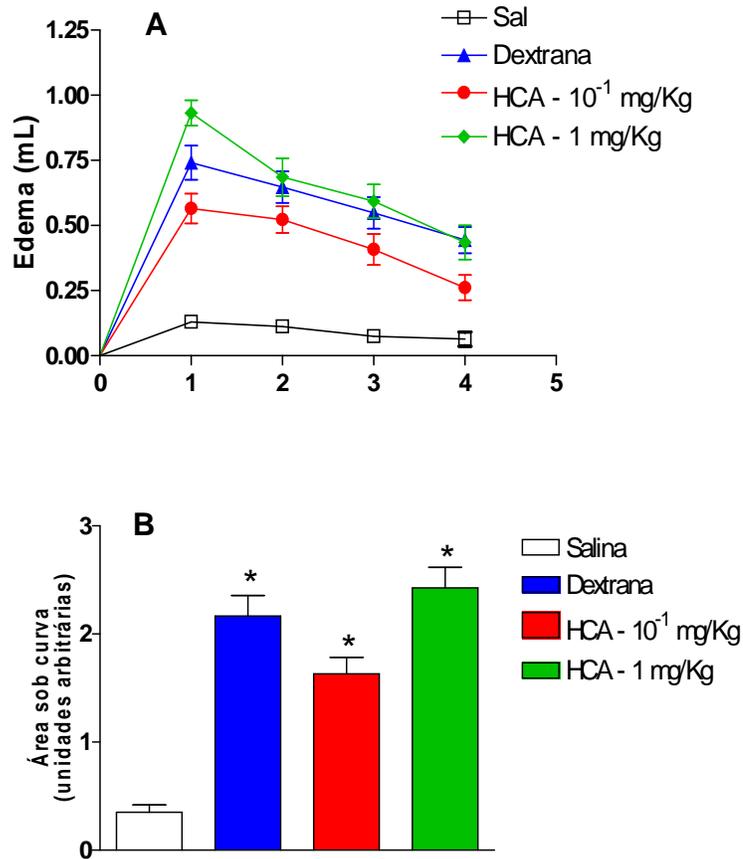


Figura 15 – A lectina de *Hypnea cervicornis* não reduz a atividade edematogênica induzida por dextrana. Edema de Pata foi induzido pela injeção s.c. de dextrana (450µg/pata). Os animais foram tratados com HCA (10⁻¹ e 1 mg/Kg; e.v) 30 minutos antes da injeção de dextrana. O grupo controle recebeu 0,1 mL de salina s.c. No painel A, as curvas representam a variação do volume das patas (mL) ± E.P.M. O painel B representa as médias da área sob a curva ± E.P.M. de cada grupo. * p < 0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo salina. (n=6) (ANOVA, teste de Bonferroni).

5.2. Estudo da atividade antinociceptiva

5.2.1. A lectina de *Hypnea cervicornis* diminui o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético: associação com mucina reverte esse efeito

HCA nas doses de 10^{-1} , 1 e 10 mg/Kg foi capaz de reduzir, significativamente, o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético quando comparados ao grupo controle. Essa redução foi de 62%, 42% e 72%, respectivamente. Morfina também reduziu (91%) significativamente as contorções abdominais.

A associação da HCA (10^{-1} mg/Kg) ao seu ligante mucina, foi capaz de inibir completamente seu efeito antinociceptivo quando comparada a dose de 10^{-1} mg/Kg diluída em salina. Além disso, a administração de Mucina sozinha, não foi capaz de promover uma diminuição das contorções abdominais de forma significativa. (Tabela 1 e Figura 16).

5.2.2. A lectina de *Hypnea cervicornis* apresenta atividade antinociceptiva somente na segunda fase no teste da formalina

Lectina de HCA, somente na dose de 10 mg/Kg, promoveu uma redução significativa do tempo que o animal permaneceu lambendo a pata, somente na segunda fase do teste da formalina. Essa redução em termos percentuais foi de 90% quando comparado ao grupo controle na mesma fase. Morfina foi capaz de reduzir tanto a primeira fase (71%) quanto à segunda fase (91%) em relação ao grupo controle. (Tabela 2 e Figura 17).

5.2.3. Lectina de *Hypnea cervicornis* não apresenta atividade antinociceptiva central avaliada pelo teste da placa quente

Somente morfina foi capaz de aumentar significativamente o tempo de reação no teste da placa quente nos intervalos de tempo de 30 e 60 min. Enquanto que HCA, nas doses utilizadas, não prolongou significativamente o tempo de reação à placa quente nos intervalos de tempo utilizados, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). (Tabela 3 e Figura 18).

5.2.4. A coordenação motora de camundongos não é afetada pela administração da lectina de *Hypnea cervicornis*.

Entre os grupos salina e HCA (1 e 10 mg/Kg) administrados e.v., em camundongos, 30 min antes de serem colocados na barra, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Somente diazepam (2 mg/Kg; i.p.) mostrou uma perda da coordenação motora significativa pelos animais nesse teste, quando comparados aos do grupo controle ($p < 0,05$). (Tabela 4 e Figura 19).

Grupo	Dose (mg/Kg; via)	Nº de Contorções (20 min)	% de inibição
Controle	-	23,9 ± 2,6	-
Morfina	5; s.c.	2,2 ± 0,5*	91
Mucina	10; e.v.	23,8 ± 2,5	-
HCA			
	10 ⁻² ; e.v.	19,0 ± 2,6	20
	10 ⁻¹ ; e.v.	9,2 ± 1,2 *	62
	1; e.v.	13,9 ± 2,1 *	42
	10; e.v.	6,8 ± 1,7 *	72
HCA + Mucina	10 ⁻¹ + 5 mg/mL; e.v.	19,6 ± 2,6 [#]	18

Tabela 1 – Efeito da lectina de *Hypnea cervicornis* no teste de contorções abdominais induzido por ácido acético em camundongos. Os valores representam a média ± E.P.M do número de contorções abdominais durante 20 min, começados a contar após 10 min da administração do ácido acético. Os animais foram tratados 30 min antes do ácido acético com mucina (5 mg/mL; e.v.) ou morfina (5 mg/Kg; s.c.) ou HCA (10⁻², 10⁻¹, 1 e 10 mg/Kg; e. v.) em solução salina ou HCA (10⁻¹ mg/Kg; e.v.) associada a mucina, respectivamente. Foram utilizados 6-11 animais por grupo. * p<0,05 indica diferença estatística significante quando comparado ao grupo controle e # quando comparado ao grupo 10⁻¹ mg/Kg. (Test Student – Neuman – Keuls).

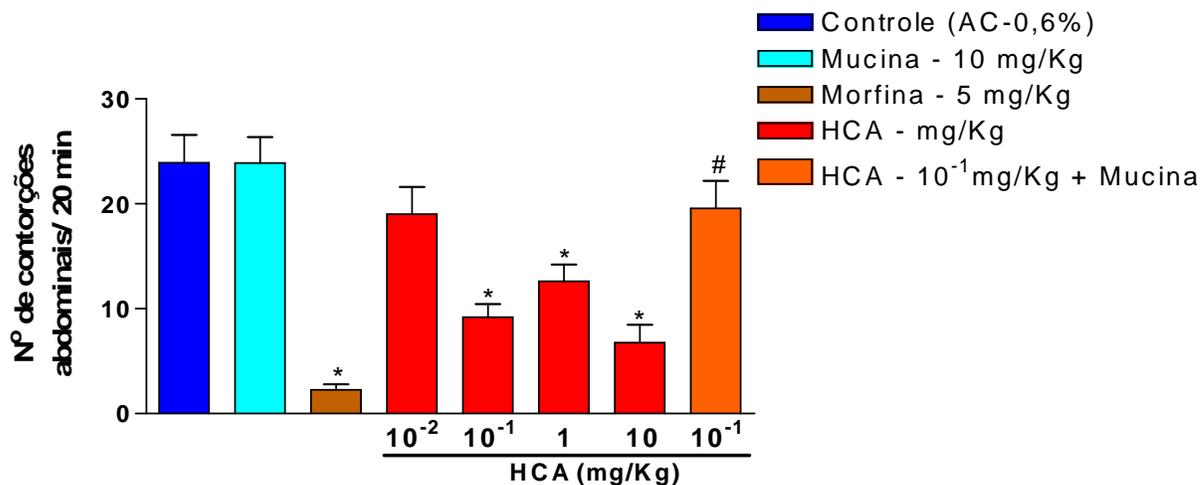


Figura 16 – A lectina de *Hypnea cervicornis* diminui o número de contrações induzidas por ácido acético: mucina reverte esse efeito. Os animais foram tratados 30 min antes do ácido acético (AC) com mucina (10 mg/Kg; e.v.) ou morfina (5 mg/Kg; s.c.) ou HCA (10⁻², 10⁻¹, 1 e 10 mg/Kg; e. v.) em solução salina ou HCA (10⁻¹ mg/Kg; e.v.) associada a mucina, respectivamente. As barras representam a média do número de contrações ± E.P.M. de 8-11 animais por grupo. * p<0,05 indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle AC e # quando comparado ao grupo 10-1 mg/Kg. (Test Student – Neuman – Keuls).

Grupo	Dose (mg/Kg; via)	1ª fase (0-5 min)	% de inibição	2ª fase (20-25 min)	% de inibição
Controle	-	68,2 ± 3,1	-	57,4 ± 5,8	-
Morfina	5; s.c.	19,4 ± 3,4*	72	0,9 ± 0,5*	98
HCA					
	10⁻¹ ; e.v.	62,8 ± 3,8	8	69,7 ± 4,3	-
	1; e.v.	58,0 ± 4,0	15	51,5 ± 5,6	10
	10; e.v.	58,4 ± 4,4	14	11,6 ± 4,2*	80

Tabela 2 – Efeito da lectina de *Hypnea cervicornis* no teste da formalina em camundongos.

Os valores representam a média ± E.P.M do tempo de lambertura em segundos de cada fase. Os animais foram tratados 30 min antes da injeção de formalina (1,2%) com salina (controle; e.v.) ou morfina (5 mg/Kg; s.c.) ou HCA (10⁻¹, 1 e 10 mg/Kg, e.v.), respectivamente. Imediatamente após a administração da formalina o tempo de lambertura foi registrado por cerca de 5 min (1ª fase) e de 20 à 25 min (2ª fase). Foram utilizados 6-11 animais por grupo. * p<0,05 indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle. (Test Student – Neuman – Keuls).

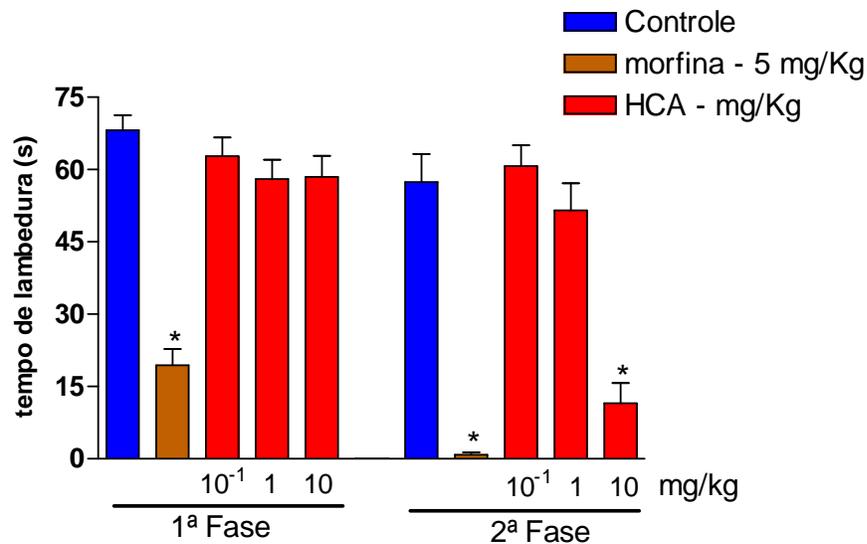


Figura 17 – A lectina de *Hypnea cervicornis* apresenta atividade analgésica periférica no teste da formalina. Os animais foram tratados 30 min antes da injeção de formalina (1,2%) com salina (controle; e.v.) ou morfina (5 mg/Kg; s.c.) ou HCA (10⁻¹, 1 e 10 mg/Kg, e.v.), respectivamente. Imediatamente após a administração da formalina o tempo de lambedura foi registrado por cerca de 5 min (1ª fase) e de 20 à 25 min (2ª fase). As barras representam a média do tempo de lambedura ± E.P.M. de 8-11 animais por grupo. * p<0,05 indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle formalina (Test Student – Neuman – Keuls).

Grupo	Dose (mg/Kg; via)	Tempo de reação (s)			
		0 min	30 min	60 min	90 min
Controle	-	13,8 ± 1,5	17,5 ± 2,3	13,7 ± 2,5	17,9 ± 3,4
Morfina	5; s.c.	16,0 ± 0,9	38,5 ± 3,6*	34,3 ± 4,0*	19,6 ± 2,6
HCA					
	10 ⁻¹ ; e.v.	17,4 ± 1,0	15,4 ± 1,1	16,6 ± 3,0	16,2 ± 2,6
	1; e.v.	16,5 ± 0,6	16,7 ± 1,8	13,4 ± 1,5	18,3 ± 1,1
	10; e.v.	16,2 ± 1,1	18,3 ± 1,4	18,4 ± 2,0	19,1 ± 3,3

Tabela 3 – Efeito da lectina de *Hypnea cervicornis* no teste da placa quente em camundongos. Os valores representam a média ± E.P.M do tempo de reação em segundos (s). Os animais foram tratados 30 min antes do teste com salina (controle positivo; e.v.) ou morfina (5 mg/Kg; s.c.; controle negativo) ou HCA (10⁻¹, 1 e 10 mg/Kg; e.v.), respectivamente. O tempo de reação que consiste em os animais saltarem ou lamberem as patas traseiras após serem colocados na placa quente (51 ± 0,5 °C) foi registrado antes (t=0) e 30, 60, 90 min após o tratamento. Foram utilizados 6-11 animais por grupo. * p<0,05 indica diferença estatística significante quando comparado ao grupo controle. (Test Student – Neuman – Keuls).

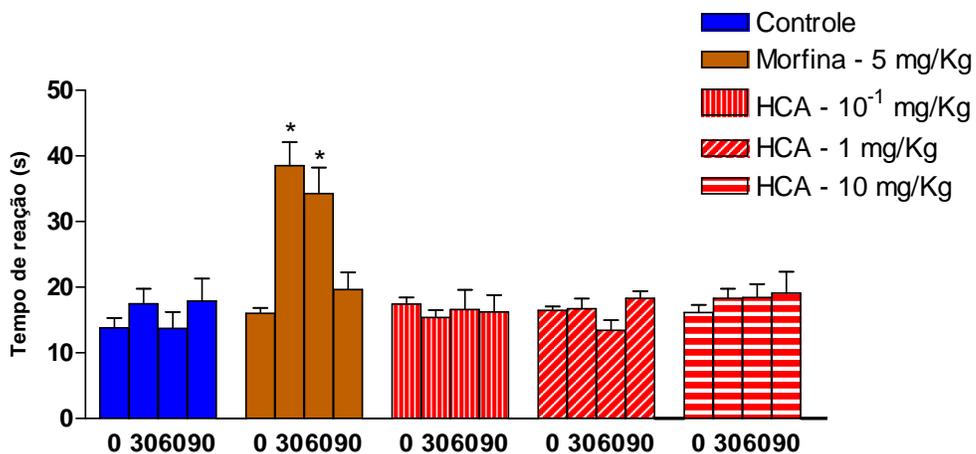


Figura 18 – A lectina de *Hypnea cervicornis* não apresenta atividade analgésica no teste da placa quente. Os animais foram tratados 30 min antes do teste com salina (controle positivo; e.v.) ou morfina (5 mg/Kg; s.c.; controle negativo) ou HCA (10⁻¹, 1 e 10 mg/Kg; e.v.), respectivamente. O tempo de reação a qual consiste em os animais saltarem ou lambereem as patas traseiras após serem colocados na placa quente (51 ± 0,5 °C) foi registrado antes (t=0) e 30, 60, 90 min após o tratamento. As barras representam a média do tempo de reação em segundos ± E.P.M. de 6-11 animais por grupo. * p<0,05 indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle (Test Student – Neuman – Keuls).

Grupo	Dose (mg/Kg; via)	Tempo de permanência na barra (s)
Controle	-	119,6 ± 0,3
Diazepam	0,5; s.c.	18,5 ± 5,1*
HCA		
	1; e.v.	117,5 ± 1,2
	10; e.v.	118,4 ± 0,7

Tabela 4 – Efeito da lectina de *Hypnea cervicornis* no teste do rota rod em camundongos. Os valores representam a média ± E.P.M do tempo de permanência na barra em segundos (s) durante 2 minutos. Os animais receberam 30 min antes de serem colocados sobre a barra: salina (controle; e.v.) ou diazepam (2 mg/Kg; i.p.) ou HCA (1 e 10 mg/Kg, e.v.), respectivamente. Foram utilizados 8 animais por grupo. * p<0,05 indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle. (Test Student – Neuman – Keuls).

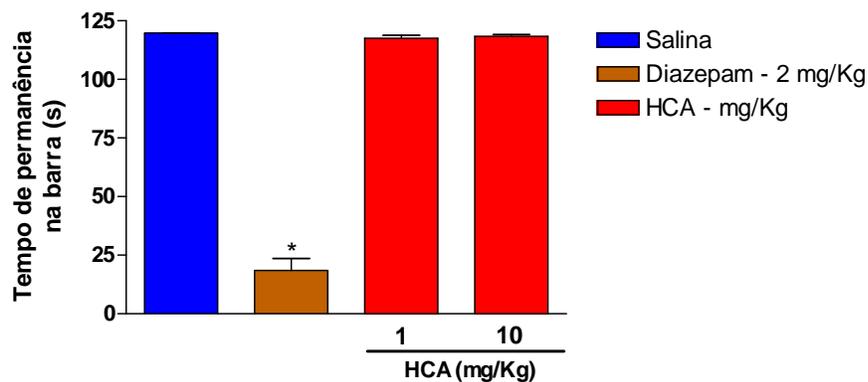


Figura 19 – A coordenação motora de camundongos não é afetada pela administração da lectina de *Hypnea cervicornis*. Os animais receberam 30 min antes de serem colocados sobre a barra: salina (controle; e.v.) ou diazepam (2 mg/Kg; i.p.) ou HCA (1 e 10 mg/Kg; e.v.), respectivamente. Os valores representam a média \pm E.P.M do tempo de permanência na barra em segundos (s) durante 2 minutos. Foram utilizados 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ indica diferença estatística significante quando comparado ao grupo controle. (Test Student – Neuman – Keuls).

5.1.13. Lectina de *Hypnea cervicornis* não promove toxicidade sub-crônica em ratos

A injeção em dose única de HCA (1mg/Kg; e.v.) durante sete dias consecutivos não provocou alteração significativa na variação de massa corporal dos animais ou no peso dos órgãos avaliados (fígado, rim e coração), quando comparado ao grupo controle injetado com salina. Foi observado após o tratamento, que todos os órgãos mostravam morfologia normal e ausência de edema. Além disso, a avaliação macroscópica do estômago demonstrou mucosas intactas, sem grau de lesão.

As dosagens de uréia e creatinina não foram significativamente diferentes do controle, ocorrendo o mesmo com as atividades cinéticas das enzimas hepáticas (aspartato amino transferase e alanina amino transferase). Como uréia, creatina e transaminases são utilizadas como parâmetro de avaliação renal e hepática, respectivamente, isto sugere o funcionamento normal do rim e fígado.

A lectina também não foi capaz de alterar o número de leucócitos circulantes no sangue (leucograma), de forma significativa, quando comparado ao grupo que recebeu somente salina, sugerindo que esta proteína não aglutinou leucócitos, ou promoveu efeitos secundários nos tecidos linfóides, mantendo preservado o número de células de defesa. (Tabela 5).

Parâmetros	^a Tratamento (0.1mL; e.v.)	
	Salina	HCA (1mg/Kg)
Varição de peso (g)	13,4 ± 1,06	11,7 ± 1,08
Fígado g/100g peso corporal	3,83 ± 0,2	4,31 ± 0,2
Rim g/100g peso corporal	0,37 ± 0,0	0,36 ± 0,0
Coração g/100g peso corporal	0,32 ± 0,0	0,36 ± 0,0
Leucócitos totais x 10 ³ / mL	12.579 ± 899,70	13.450 ± 1354,00
Neutrófilos x 10 ³ /mL	1.550 ± 301,70	1.341 ± 278,30
Uréia (mg/dL)	33,83 ± 1,7	38,00 ± 1,1
Creatinina (mg/dL)	0,38 ± 0,0	0,34 ± 0,0
AST (UI/L)	66,67 ± 3,7	68,83 ± 3,4
ALT (UI/L)	35,50 ± 1,2	40,83 ± 2,4

Tabela 5 – A lectina de *Hypnea cervicornis* não altera parâmetros na avaliação da toxicidade sub-crônica em ratos. (a) Ratos foram injetados diariamente com uma única dose de HCA (1 mg/Kg; e.v.) durante sete dias. Após este período de tratamento os animais foram pesados, realizada a coleta do sangue para leucograma e dosagens bioquímicas; sacrificados e os órgãos retirados para posterior análise. Os valores representam a média ± E.P.M. de 7 animais. (ANOVA, teste de Bonferroni).

5.1.14. A injeção de *Hypnea cervicornis* não promove alteração na pressão arterial de ratos

A administração de HCA em ratos submetidos à canulação na artéria carótida não alterou a pressão arterial de ratos durante os 40 min de observação quando comparados ao grupo controle que recebeu somente salina e.v. (Figura 20).

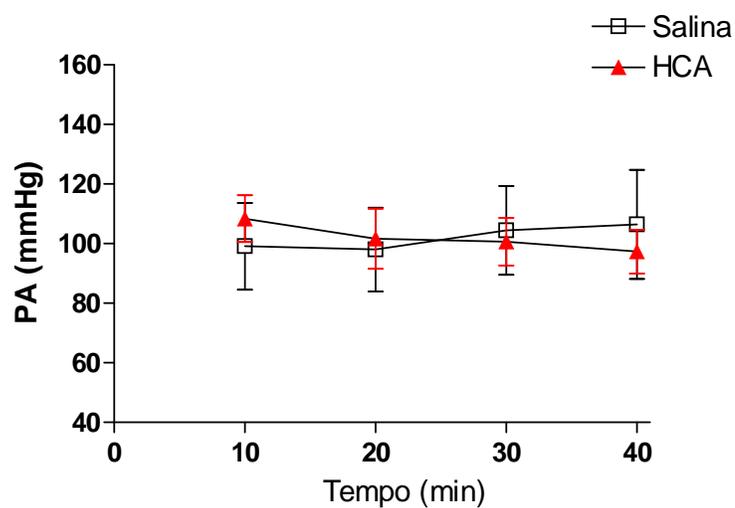


Figura 20 – A lectina de *Hypnea cervicornis* não altera a PA em ratos normais. A pressão arterial (PA) foi avaliada 24 h após a canulação da artéria carótida dos animais. HCA (1 mg/Kg) ou salina foram injetadas e.v. 30 min antes do início da avaliação da PA. As curvas representam a variação da PA em mmHg \pm E.P.M de 6 animais por grupo. (ANOVA, teste de Bonferroni).

Discussão

6. DISCUSSÃO

Os neutrófilos são os principais leucócitos a participarem na defesa contra patógenos e sua migração dos vasos sanguíneos para o tecido lesado é processo crucial de resposta do hospedeiro contra infecções por microorganismos (MALECH & GALLIN, 1987). Embora estas células tenham um papel protetor na inflamação, o dano ao tecido causado por doenças imuno inflamatórias, é uma consequência deletéria da intensa migração de neutrófilos (JONES *et al.*, 1991).

Neste estudo, demonstrou-se que a lectina isolada da alga marinha vermelha *Hypnea cervicornis* (HCA) apresenta efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos em modelos de inflamação (edema de pata e peritonite) e nocicepção (contorção abdominal induzida por ácido acético e formalina). Os efeitos da HCA nos modelos de inflamação utilizados, parecem estar relacionados com a diminuição da migração de leucócitos para o foco da inflamação.

Está descrito na literatura que a carragenina é um agente flogístico indireto que no peritônio induz migração de neutrófilos dependente da ativação de macrófagos residentes (SOUZA *et al.*, 1988) e o fMLP é um peptídeo com reconhecida atividade quimiotática direta sobre neutrófilos (RIBEIRO *et al.*, 1996).

Assim, no presente trabalho delineou-se investigar o efeito da HCA sobre a migração de neutrófilos induzida de forma direta e indireta, usando como estímulos inflamatórios a carragenina e o fMLP, no modelo de peritonite em ratos.

Tanto na peritonite induzida por Cg quanto por fMLP, a HCA nas doses de 10^{-1} , 1 e 10 mg/Kg demonstrou efeito antiinflamatório ao reduzir de forma significativa a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais, mostrando similaridade com o corticóide utilizado, dexametasona. Em trabalho recente, utilizando-se a lectina de *Araucaria augustifolia* foi demonstrado efeito antiinflamatório semelhante (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006).

Na resposta inflamatória aguda ocorre o recrutamento de neutrófilos do sangue para o tecido injuriado, onde estão envolvidos processos complexos e multimedidos, nos quais estão incluídas interações seqüenciais entre os neutrófilos e células endoteliais e componentes da matriz extracelular. O controle destes mecanismos envolve a ativação de receptores presentes nas células

endoteliais e sangüíneas bem como a expressão de glicoproteínas adesivas na membrana celular (McEVER, 1992).

A especificidade molecular dos leucócitos tendo como alvo os locais de inflamação é mediada pelas lectinas de membranas, selectinas, integrinas, e a superfamília de imunoglobulinas, que devido à correlação destas com os mecanismos de interação e adesividade entre diversas moléculas, leucócitos e células endoteliais, são conhecidas como moléculas de adesão. (SIMON & GREEN, 2005).

A adesão ao endotélio é um pré-requisito para a infiltração dos neutrófilos no local da inflamação. Este processo é mediado pelas selectinas, que através de domínios lectínicos reconhecem e interagem de forma específica com carboidratos de superfície. Entre as moléculas envolvidas na adesão firme de neutrófilos estão CD11b/CD18 (nos neutrófilos) ou ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais (ROBBINS *et al.*, 2005).

Estudos da base molecular de adesão de selectinas têm sido focalizados principalmente no reconhecimento de carboidrato pelo domínio lectínico (FEIZI, 1993; ROZEN & BERTOZZI 1994). A identificação de ligantes fisiológicos para selectinas tem sido alvo de muitos estudos, pois como muitas lectinas, as selectinas podem se ligar a uma variedade de estruturas de carboidratos *in vitro* (TEDDER *et al.*, 1995).

Glicoproteínas do tipo mucina parecem desempenhar um papel chave no processo de interação leucócito-endotélio, provavelmente através da presença de carboidratos ligantes de selectinas (PANÉS *et al.*, 1999; LEY 2002; TEDDER *et al.*, 1995). Mannori *et al* (1995) sugeriram que L- e P-selectinas interagem com ligantes do tipo mucina em linhagens de células de câncer de colo.

Assim o potencial terapêutico de drogas que tenham como alvo a interação leucócitos-endotélio para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas parece promissora. O desenvolvimento de drogas seguras e efetivas que possuam como alvo esses componentes moleculares envolvidos no rolamento e adesão dos leucócitos na resposta inflamatória pode render um novo campo, com terapias melhoradas para as desordens associadas com a inflamação (PANÉS *et al.*, 1999).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a importância da interação leucócito-endotélio no tocante a atividade antiinflamatória da lectina isolada de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL). Esta proteína foi hábil em reduzir o rolamento e adesão dos leucócitos no endotélio vascular mesentérico de camundongos estimulados com carragenina (NAPIMOGA *et al.*, 2007). Outras lectinas também foram capazes de reduzir esta interação de leucócitos *in vitro* e *in vivo* (COELHO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006).

De fato, o mecanismo pelo qual a HCA inibe a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, parece estar relacionado com efeitos vasculares, considerando que esta lectina foi capaz de reduzir o rolamento e adesão de leucócitos no endotélio vascular de animais submetidos a peritonite induzida por Cg.

Reforçando esta ideia, está a demonstração de que HCA não foi capaz de diminuir de forma significativa a concentração das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1, no exsudato peritoneal de animais submetidos a peritonite por Cg. As citocinas TNF- α e IL-1 são liberadas por células residentes na fase aguda do processo inflamatório ativado por estímulos imunes ou não-imunes (DINARELLO, 2000). Essas citocinas quando injetadas em diferentes modelos animais induzem migração de neutrófilos (CASALE & CAROLAN, 1999; BOMBINI *et al.*, 2004). Além disso, a neutralização dessas moléculas ou seus receptores reduzem a migração de leucócitos induzida por diferentes estímulos inflamatórios (SMEETS *et al.*, 2005; FELDMANN & PUSEY, 2006). Dessa forma, podemos sugerir que o efeito antiinflamatório da HCA no modelo de peritonite, parece não estar diretamente relacionado à eventos ocorridos no foco inflamatório, considerando a sua incapacidade de interferir na síntese/liberação de citocinas pró-inflamatórias por células residentes.

Conforme já proposto primeiramente por Assreuy *et al* (1997) para lectinas de leguminosas, há uma relação importante de seus carboidratos ligantes com seus efeitos antiinflamatórios. No presente trabalho, investigou-se o papel do sítio de ligação da HCA ao seu ligante específico (glicoproteína mucina), no seu efeito sobre a migração de neutrófilos no modelo de peritonite induzido por Cg. Os resultados, demonstraram que quando a HCA foi injetada associada à mucina, seu efeito antiinflamatório era totalmente abolido. Estes dados sinalizam para a

hipótese do envolvimento do sítio ligante da HCA à mucina no seu efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos. Reforçando esta especulação, estão as demonstrações da importância do sítio ligante à carboidratos de outras lectinas para a eliciação de seus efeitos biológicos, quer sejam pró- ou antiinflamatórios (ALENCAR *et al.*, 1999; 2005; 2005a; 2005b; 2005c; FREIRE *et al.*, 2003; MOTA *et al.*, 2006; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006).

Diante dos achados acima, pode-se sugerir que a inibição da migração de neutrófilos para o foco inflamatório pela HCA, esteja ocorrendo *via* interação de seu sítio de ligação à mucina com moléculas endógenas importantes para o processo de rolamento e adesão dos neutrófilos no endotélio vascular.

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

Diante desses achados, decidiu-se investigar a importância da estrutura tridimensional da HCA na efetivação de seus efeitos antiinflamatórios. Para tanto, sua estrutura terciária foi alterada através de desnaturação térmica. Observou-se que a desnaturação da proteína bloqueou completamente o seu efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos no modelo de peritonite. Esse achado está de acordo com a literatura, onde se demonstra a importância da integridade da estrutura tridimensional de proteínas em suas atividade pró- ou antiinflamatória (ALENCAR *et al.*, 2003; ALENCAR *et al.*, 2004b).

Está bem demonstrado na literatura a participação do óxido nítrico (NO) no processo inflamatório. Estudos demonstraram que o NO também interfere com o recrutamento de neutrófilos podendo inibir ou induzir a migração dessas células (IALENTI *et al.*, 2000; PAUL-CLARK *et al.*, 2001; MCCARTNEY-FRANCIS *et al.*, 2001).

A administração de inibidores de NOS promove efeito antiinflamatório relacionado à inibição da migração celular (ROCHA *et al.*, 2002; AJUEBOR *et al.*, 1998; CUZZOCREA *et al.*, 1997).

Resultados semelhantes foram observados em cobaias pela co-administração intradérmica de plasma ativado por zymosan e L-NAME, promovendo uma inibição significativa da acumulação de polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos). Além disso, houve uma reversão dessa inibição quando um doador de NO, o nitroprussiato de sódio, foi administrado (FACCIOLI *et al.*, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 1993). No modelo de artrite induzida pela parede de *Streptococcus*, a administração de L-NMMA inibiu o influxo celular para a cavidade articular dos animais (MCCARTNEY-FRANCIS *et al.*, 1993). Ademais, a administração do composto L-NAME em ratos promoveu a diminuição da migração de eosinófilos no modelo de pleurite provocado pela injeção de bradicinina, PAF, LPS ou carragenina (FERREIRA *et al.*, 1996).

Cardell *et al* (2000) demonstraram que o leucotrieno B4 foi efetivo em aumentar a secreção e o recrutamento de neutrófilos nas vias aéreas de cães. Este efeito foi inibido quando os animais foram tratados com L-NAME, inibidor seletivo para NOS. Já no modelo do edema de pata em camundongos induzido por enterotoxina B de *Staphylococcus*, observou-se aumento da exsudação e dos níveis de mieloperoxidase, indicando a presença de leucócitos ativados. O edema e a atividade de mieloperoxidase foram inibidos quando os animais receberam tratamento prévio com L-NAME ou aminoguanidina, por via intravenosa ou subplantar (FRANCO-PENTEADO *et al.*, 2001). Outros estudos ainda relataram que na pleurisia induzida por carragenina ocorreu aumento da migração de leucócitos e dos níveis de metabólitos do óxido nítrico (SALEH *et al.*, 1999; DALMARCO *et al.*, 2002; 2004).

Por outro lado, embora os mecanismos pelos qual o NO reduz o acúmulo de neutrófilos ainda não estejam completamente elucidados, Kubes *et al* (1991)

demonstraram, que o NO pode ser um importante inibidor endógeno de adesão leucocitária em vênulas pós-capilares, pois a inativação do NO pela produção identificada de O_2^- pelas células endoteliais e/ou neutrófilos, ou a inativação da produção do NO pelos inibidores de NOS (L-NMMA e L-NAME) pôde contribuir com a aderência leucocitária.

Outras pesquisas também demonstraram esse efeito de amenização a uma resposta inflamatória aumentada, além de um efeito protetor contra os danos provocados pela isquemia-reperfusão dependentes de leucócitos, através do NO endógeno ou doado exogenamente, reduzindo o *rolling* e a adesão (expressão de moléculas de adesão) em células endoteliais vasculares (KOSONEN *et al.*, 2000; SECCO *et al.*, 2004). Secco *et al* (2004) corroborando esses achados, demonstraram um aumento significativo da migração neutrofílica em animais pré-tratados com inibidores específico e não específico de NOSi submetidos à peritonite induzida por carragenina ou LPS e que a administração de L-arginina reverteu este aumento.

De acordo com Liaudet *et al* (2000) a ativação da guanilato ciclase solúvel pelo NO constitui a principal via de sinalização deste gás, que envolve a regulação de várias funções biológicas, incluindo não só o relaxamento do músculo liso seja ele vascular ou não vascular, mas também como transdutor no sistema nervoso central, inibição da agregação plaquetária e inibição da adesão leucocitária no endotélio.

SECCO *et al* (2006) mostraram que o efeito inibitório do NO sobre a expressão de ICAM-1 é mediado via ativação da guanilato ciclase solúvel, pois inibidores da NOS e o inibidor solúvel da guanilato ciclase (ODQ) foram capazes de aumentar a migração de neutrófilos em modelo de peritonite induzida por Cg e LPS, mas os animais tratados com um doador de NO (S-nitroso-N-acetilpenicilamina) foram capazes de apresentar uma redução na migração dessas células.

Al-Swayeh *et al* (2000a; 2000b), demonstraram em modelos animais de inflamação que a administração de DAINES associados ao NO (Nitroparacetamol e Nitroaspirina; NO-DAINES) apresentaram efeitos antiinflamatórios mais benéficos quando comparados aos mesmos fármacos sem a presença da molécula de NO. Keeble e Moore (2002) relataram que os DAINES associados

ao NO quando comparados ao DAINES, apresentaram uma marcante diminuição dos danos gastrointestinais, causados por estes últimos, e foram capazes de aumentar a eficácia antiinflamatória e antinociceptiva dos DAINES. Foi demonstrado também que o nitroparacetamol exibiu hepatoproteção em oposição à atividade hepatotóxica do paracetamol. Assim há possibilidade de que NO-DAINES ou doadores de NO possam trazer algum benefício terapêutico em uma larga variedade de patologias, incluindo dor e inflamação, trombose, doenças neurodegenerativas do SNC, colites, câncer, incontinência urinária, etc. Ficam evidentes as crescentes pesquisas enfatizando drogas doadoras de NO como uma alternativa terapêutica (MILLER & MEGSON 2007).

A produção de NO por lectinas de leguminosas isoladas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora*, *Pisum arvense* e *Concanavalina A* foi demonstrado por Andrade *et al* (1999) ao qual evidenciaram a capacidade dessas lectinas em induzirem a produção de NO *in vitro* e *in vivo* por macrófagos peritoneais através da administração local dessas lectinas. Estes autores sugerem que este efeito pode estar envolvido nas atividades antitumoral e antiparasitária dessas lectinas.

Mais recentemente, em outro estudo realizado *in vitro* demonstrou-se que macrófagos murinos quando isolados do peritônio, e tratados com a lectina de *Concanavalina A*, foram capazes de induzir um aumento na produção de NO e na expressão de NOS α por diferentes ligantes aos receptores Toll-like (SODHI *et al.*, 2007). Kesherwani e Sodhi (2007) também demonstraram, *in vitro*, a capacidade de lectina de Concanavalina A e a fitohemaglutinina em induzir a produção de NO e a expressão de NOS α em macrófagos murinos.

Lima *et al* (2004) evidenciaram que a lectina de *Bryothamnion triquetrum* foi capaz de promover relaxamento de anéis de aorta isolados de rato dependente de óxido nítrico e que a associação da lectina com mucina inibiu o relaxamento induzido por esta, sugerindo a importância do domínio lectínico com seu ligante específico. Mais tarde, Gadelha *et al* (2005) demonstrou que a lectina de *Canavalia marítima* foi capaz de induzir relaxamento da aorta isolada de ratos dependente de NO.

Diante das informações expostas, fomos investigar se a atividade antiinflamatória demonstrada pela HCA poderia estar relacionada à produção de

NO. Como primeira abordagem, verificamos se o tratamento com a lectina acarretaria em modificações nos níveis sanguíneos de NO. Como resultado, demonstrou-se que a HCA foi capaz de aumentar a produção de NO (via aumento dos níveis de nitrito) no soro dos animais submetidos à peritonite induzida por Cg e que tanto o inibidor não seletivo, L-Nitro-Arginina, quanto o seletivo, aminoguanidina, para NOSi inibiram a atividade antiinflamatória da lectina. Estes resultados são consistentes e confirmam a hipótese inicial da participação do NO na atividade antiinflamatória da HCA.

Um efeito associado à liberação inicial de NO é a queda da pressão arterial. Assim, como a lectina de HCA foi capaz de induzir a produção de NO a nível sistêmico, cogitamos também a interferência de um possível efeito hipotensor desta proteína na sua atividade antiinflamatória. Entretanto, esta hipótese foi descartada considerando que a pressão arterial dos animais não foi alterada pelo tratamento com a HCA.

O efeito sobre a inibição da migração de neutrófilos devido a uma possível hemaglutinação ou uma leucopenia pela HCA, foi descartado através da avaliação do leucograma de animais que receberam a lectina em dose antiinflamatória após a quarta hora de sua administração. A HCA não alterou nenhum dos parâmetros avaliados no leucograma (resultados não mostrados).

De posse dos resultados obtidos com a HCA até esta etapa do trabalho, e considerando que o NO atua inibindo a migração de leucócitos no endotélio vascular (neutrófilos), elaboramos as seguintes hipóteses para o mecanismo da atividade antiinflamatória da HCA: 1) a lectina age diretamente sobre as moléculas de interação leucócito/endotélio (selectinas e seus ligantes do tipo mucina); e/ou 2) a lectina quando injetada sistemicamente é capaz de induzir a produção de NO.

Com o intuito de investigar se a HCA atuava diretamente sobre neutrófilos, avaliamos o efeito desta sobre a quimiotaxia de neutrófilos induzida pela quimiocina MIP-2 *in vitro*. A lectina, nas duas concentrações utilizadas foi ineficiente em reduzir a quimiotaxia induzida por MIP-2. Resultado semelhante foi demonstrado para a lectina de *Lonchocarpus sericeus* (NAPIMOGA *et al.*, 2007). Entretanto, considerando que esta abordagem foi realizada utilizando a HCA somente em duas concentrações, não podemos descartar um possível efeito

inibitório da HCA na quimiotaxia *in vitro*. Futuras abordagens, utilizando HCA em diferentes concentrações merecem ser realizadas para formulação de afirmações consistentes.

A dextrana é um agente inflamatório conhecido por provocar a liberação de aminas vasoativas (histamina e serotonina), por degranulação mastocitária, causando assim um edema osmótico, acelular caracterizado por aumento de permeabilidade vascular e extravasamento de fluido (PARRAT *et al.*, 1958; LO *et al.*, 1982; BASTOS *et al.*, 2001). No presente trabalho, ratos tratados com HCA e.v., 30 min antes da injeção subcutânea intraplantar de dextrana, não apresentaram uma redução eficiente (significativa) do edema de pata produzido por este estímulo inflamatório.

A carragenina (Cg) é um composto químico vastamente utilizado em modelos farmacológicos, por induzir uma reação inflamatória aguda envolvendo liberação de mediadores que resultam em mudanças na permeabilidade vascular e formação de edema. Portanto, o edema induzido por esta substância flogística é empregado como modelo experimental para o estudo farmacológico de diversas substâncias na inflamação (WINTER *et al.*, 1962; Di ROSA *et al.*, 1970). É relatado que drogas antiinflamatórias esteroidais e não-esteroidais como, por exemplo, dexametasona e indometacina são capazes de inibir sua ação (HENRIQUES *et al.*, 1987). Assim, substâncias capazes de inibi-lo têm sido consideradas, do ponto de vista de eficácia farmacológica, boas candidatas a agentes antiinflamatórios (GODHWANI *et al.*, 1987).

O edema de pata induzido pela injeção de carragenina, em ratos, está associado com a produção de diferentes mediadores inflamatórios, incluindo, histamina, serotonina, bradicinina, óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, cuja liberação é intimamente associada à migração de leucócitos para o sítio inflamatório (CARVALHO *et al.*, 1996; HAJARE *et al.*, 2001; SRINIVASAN *et al.*, 2001). De fato, a HCA quando injetada por via endovenosa inibiu o edema de pata induzido por carragenina, principalmente na 3ª hora (82%) após a injeção do agente flogístico Cg. O efeito antiedematogênico da lectina foi semelhante ao observado pelo uso da dexametasona.

Dextrana e carragenina induzem aumento da permeabilidade vascular por diferentes caminhos. Enquanto a dextrana induz o acúmulo de fluidos devido à

degranulação de mastócitos e conseqüentemente a liberação dos mediadores inflamatórios histamina e serotonina, com poucas proteínas e neutrófilos; a carragenina, por sua vez, o faz com um exsudato contendo grande número de neutrófilos e rico em proteínas (LO *et al.*, 1982).

Portanto, assim como no modelo de peritonite, também no modelo de edema de pata a HCA parece estar inibindo processo inflamatório dependente de células, uma vez que esta apresentou atividade antiinflamatória no edema induzido pelo agente flogístico Cg, mas não por dextrana.

É evidente a íntima relação entre o processo inflamatório e o desenvolvimento de uma sensação dolorosa.

Atualmente, o interesse para o uso clínico de novas substâncias com atividade analgésica, utilizadas principalmente para o tratamento de vários tipos de dor (tanto de origem neurogênica quanto inflamatória), vem aumentando significativamente. Vários modelos de nocicepção em animais de laboratório foram desenvolvidos para verificar a atividade analgésica de extratos e compostos. Entre os modelos de nocicepção utilizados neste trabalho, o teste das contorções abdominais, induzidas pelo ácido acético, é descrito como um típico modelo para avaliar a dor de origem inflamatória, pouco específico, mas com boa sensibilidade, sendo uma ferramenta de triagem para avaliação da atividade analgésica e antiinflamatória de novos agentes (IKEDA *et al.*, 2001; LE BARS *et al.*, 2001). Esse teste pode ser considerado um teste pré-clínico de importância para avaliação do efeito antinociceptivo, porque permite uma correlação adequada entre o valor da dose eficaz, obtido em animais, e as doses analgésicas em humanos (COLLIER *et al.*, 1968).

Neste modelo, a administração de um agente irritante para membrana serosa, como o ácido acético, provoca comportamentos estereotipados que são caracterizados por contorções abdominais, redução e incoordenação da atividade motora. Estes comportamentos são considerados reflexos e evidenciam a dor visceral (LE BARS *et al.*, 2001). Através da realização deste teste, foi possível observar que a administração sistêmica, da lectina de HCA reverteu, de maneira significativa, o número de contorções abdominais produzidas pela injeção i.p. de ácido acético em camundongos. A irritação local, provocada pela administração deste agente na cavidade intraperitoneal desencadeia a liberação de vários

mediadores como a bradicinina, substância P e prostaglandinas, principalmente a PGI₂, bem como algumas citocinas como IL-1 β , TNF α e IL-8 (CORREA *et al.*, 1996; RIBEIRO *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001). Estes mediadores ativam nociceptores quimiosensíveis que contribuem com o desenvolvimento da dor de origem inflamatória. Dessa forma, o resultado obtido neste trabalho sugere que o efeito antinociceptivo de HCA pode estar relacionado à inibição da liberação de mediadores, induzida pelo ácido acético, e mais ainda pela inibição da migração de células que exacerbariam o processo doloroso. Então HCA foi capaz de reduzir as contorções em 62%, 42% e 72% para as doses de 10⁻¹, 1 e 10 mg/Kg, respectivamente. O seu ligante específico mucina inibiu a capacidade da lectina em inibir o número de contorções.

Outro modelo empregado neste trabalho foi o de nocicepção induzida por formalina. Este modelo consiste na injeção intraplantar ou subcutânea desta substância. A resposta provocada pela formalina constitui-se de duas fases de nocicepção: uma fase inicial e uma tardia, que parecem envolver mediadores químicos diferentes (TJOLSEN & HOLE, 1997; VANEGAS & SCHAIBLE, 2001).

A fase inicial é caracterizada pela dor de origem neurogênica causada pela estimulação química direta dos nociceptores das fibras sensoriais aferentes, principalmente fibras do tipo C. A fase tardia é representada pela dor de origem inflamatória que é desencadeada por uma combinação de estímulos que incluem inflamação nos tecidos periféricos e mecanismos de sensibilização espinhal e central. (TJØSEN *et al.*, 1992; TJØLSEN & HOLE, 1997). Vários trabalhos têm demonstrado que a administração intraplantar de formalina em roedores produz significativo aumento dos níveis espinhais de diferentes mediadores como aminoácidos excitatórios, neuropeptídeos, PGE₂, óxido nítrico e cininas (MALMBERG e YARSH, 1995; SANTOS e CALIXTO, 1997; OMOTE *et al.*, 1998).

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível mostrar que a lectina de HCA, inibiu em (80%) o tempo de lambertura das patas dos animais, somente na segunda fase do teste e na dose de 10 mg/Kg. E isso corrobora com os resultados dos experimentos de inflamação no qual a lectina então estaria inibindo a migração de células ao local injuriado e conseqüentemente, inibindo a transdução da dor. Conforme já descrito na literatura, drogas como os narcóticos, os quais primariamente atuam centralmente, inibem ambas as fases igualmente (HUNSKAAR *et al.*, 1985; SHIBATA *et al.*, 1989), mas a ação de drogas como os

DAINES e dexametasona somente inibem a segunda fase na nocicepção induzida por formalina (SHIBATA *et al.*, 1989; CHEN *et al.*, 1995). Em nossos resultados, morfina foi capaz de reduzir tanto a primeira fase (71%) quanto à segunda fase (91%) do teste.

O teste da placa quente indica a resposta ao estímulo térmico que é associado à neurotransmissão central (HUNSKAAR *et al.*, 1986). O comportamento do animal de “sapatear” ou lambe as patas é a indicação da resposta ao estímulo nociceptivo térmico, enquanto que a latência para o aparecimento desta resposta é cronometrada em segundos.

Conforme já evidenciado a HCA não foi capaz de apresentar efeito antinociceptivo durante a primeira fase do teste da formalina e no teste da placa quente em todas as doses utilizadas, HCA não foi capaz de aumentar o tempo de reação dos animais. Somente morfina aumentou significativamente o tempo de reação.

Os resultados obtidos no presente estudo de nocicepção também demonstraram que a HCA não apresentou qualquer interferência sobre a atividade locomotora, causando incoordenação motora, assegurando que o efeito antinociceptivo observado não está relacionado a estes efeitos inespecíficos.

Recentes trabalhos têm demonstrado efeito analgésico de lectinas de algas tanto a nível central quanto periférico. Neves *et al* (2007) demonstraram esses efeitos para a lectina de alga marinha *Amansia multifida* Lamouroux. Viana *et al* (2002) demonstraram atividade central e periférica para as lectinas isoladas das algas marinhas vermelhas *Bryothamnium seaforthii* e *Bryothamnium triquetrum*.

No tocante a lectina de HCA, os resultados sugerem efeito analgésico periférico o que corrobora com o estudo de sua atividade antiinflamatória já descrita.

Apesar dos relatos da via NO-GMPc como efeito analgésico do NO (VALE *et al.*, 2007; JAIN *et al.*, 2001) os resultados nesse estudo não são suficientes para estipular que, assim como aconteceu no modelo de peritonite, o NO, esteja envolvido no efeito antinociceptivo da HCA. Estudos complementares precisam ser realizados no sentido de esclarecer o mecanismo antinociceptivo da HCA.

Considerando que a HCA demonstrou apresentar atividade antiinflamatória e esta atividade parece ser a nível sistêmico via produção de NO e/ou interação da lectinas com ligantes de selectinas, objetivou-se então avaliar alguns parâmetros de toxicidade subcrônica em ratos tratados por sete dias com a dose antiinflamatória (1 mg/Kg). Não foram observadas nenhuma alteração morfológica nos órgãos avaliados (rim, coração, fígado e estômago). Parâmetros que avaliaram função renal (uréia e creatinina), função hepática (AST e ALT), número de leucócitos circulantes (sangüíneos) e variação de massa não foram alterados quando comparados ao grupo salina. Resultados semelhantes foram demonstrados por Mota *et al* (2006) e Napimoga *et al* (2007) em relação as lectinas de *Araucaria augustifolia* e *Lonchocarpus sericeus*, respectivamente.

Tendo em vista o crescente interesse em buscar na natureza moléculas com potencial terapêutico para resolução/cura de processos patológicos, a lectina isolada da alga vermelha *Hypnea cervicornis*, credencia-se como uma ferramenta potente a ser explorada e uma possível utilização na elaboração de drogas que possam ser usadas no tratamento da inflamação e da dor. É importante ressaltar que os efeitos demonstrados para HCA neste trabalho, foram inéditos no tocante a lectinas de algas.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho nos permitem concluir que:

- Nas doses testadas, HCA foi capaz de inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal tanto por um estímulo quimiotático direto (fMLP) quanto por um indireto (Cg), nesse último de forma dose-dependente;
- A manutenção da estrutura terciária da HCA é relevante para suas atividades biológicas;
- A lectina diminui o rolamento e adesão de leucócitos em vênulas mesentéricas;
- A atividade antiinflamatória da lectina parece envolver a participação de NO, pois esta é capaz de induzir a liberação desse mediador, a nível sistêmico, e seus inibidores (L-Nitro-Arginina e aminoguanidina) são capazes de bloquear a atividade da lectina;
- HCA parece exercer sua ação antiinflamatória via interação do domínio lectínico;
- A participação de HCA a nível local parece ser descartada, pois essa não foi capaz de inibir síntese/liberação de citocinas pró-inflamatórias no fluido peritoneal;
- HCA aparenta não possuir atuação direta sobre neutrófilos nas doses utilizadas;
- A lectina de HCA apresenta atividade antiedematogênica no edema de pata induzida por carragenina, mas não por dextrana indicando a participação de células nesse processo;
- A HCA demonstra uma atividade antinociceptiva no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético sugerindo atividade antinociceptiva;
- A atividade antinociceptiva da HCA no modelo de formalina ocorre somente na segunda fase, sugerindo uma ação da HCA na fase inflamatória da dor;

- A HCA não apresentou efeito antinociceptivo central no modelo da placa quente, corroborando assim sua atividade periférica;
- A atividade locomotora dos animais não foi alterada pela administração da lectina sugerindo que a mesma não promove um efeito relaxante muscular.
- HCA não altera a pressão arterial sistêmica nem o leucograma após sua administração aguda;
- HCA quando administrada de forma sub-crônica durante sete dias não promoveu alterações hepáticas e renais, nem no perfil leucocitário sanguíneo e na massa corporal.

Referências

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B.B. & NATARAJAN K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur. Cytokine Netw.*, v. 7, p. 93-124, 1996.

AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H.; FREITAS, A.L.P.; BENEVIDES, N.M.B.; MAPURUNGA, S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *B. triquetrum*. *Revis. Brasil. Fisiol., Vegetal.* v. 7, p. 15-19, 1995.

AJUEBOR, M.N.; VIRAG, L.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M.; SZABO, C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. *Immunology*, v. 95, p. 625-630, 1998.

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

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; DE MOURA, T.R.; DE SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, v. 374, p. 275-282, 2007.

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

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, v. 35, p. 1674-1681, 2003.

ALENCAR, N.M.N.; CAVALCANTE, C.F.; VASCONCELOS, M.P.; LEITE, K.B.; ARAGÃO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; CAVADA, B.S.; VALE, M.R. Anti-inflammatory and anti-microbial effect of lectin from *Lonchocarpus*

sericeus seeds in an experimental model of infectious peritonitis. J. Pharm. Pharmacol., v. 57, p. 919-922, 2005.

ALENCAR, N.M.N.; FIGUEREDO, I.S.T.; VALE, M.R.; BITENCOURT, F.S.; OLIVEIRA, J.S.; RIBEIRO, R.A.; RAMOS, M.V. Antiinflammatory Effect of the Latex from *Calotropis procera* in Three Different Experimental Models: Peritonitis, Paw Edema and Hemorrhagic Cystitis. Planta Med., v. 70, p. 1144-1149, 2004b.

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

ALENCAR, V.B.M.; ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; MOTA, M.L.; BRITO, G.A.C.; ARAGÃO, K.S.; BITENCOURT, F.S.; PINTO, V.P.T.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. Int. J. Biochem. Cell. Biol., v. 37, p. 1805-1814, 2005a.

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

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

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

AL-SWAYEH, O.A.; FUTTER, L.E.; CLIFFORD R.H.; MOORE, P.K. Nitroparacetamol exhibits anti-inflammatory and anti-nociceptive activity. Br. J. Pharmacol., v. 130, p. 1453-1456, 2000a.

AL-SWAYEH, O.A.; CLIFFORD R.H.; DEL SOLDATO, P.; MOORE, P.K. A comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of nitroaspirin and aspirin. *Br. J. Pharmacol.*, v. 129, p. 343-350, 2000b.

ANDRADE, C.A.; CORREIA, M.T.; COELHO, L.C.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Int J Pharm.*, v. 8,, p. 435-445, 2004.

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

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

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

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

ASSREUY, A.M.S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; SOUZA, M.L.P.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators Inflamm.*, v. 6, p. 201-210, 1997.

BAEZ S. Simultaneous measurements of radii and wall thickness of microvessels in the anesthetized rat. *Circ. Res.*, v. 25, p. 315–329, 1969.

- BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.M.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. *Immun. Invest.*, v. 21, p. 297-303, 1992.
- BASTOS, J.K.; CARVALHO, J.C.; DE SOUZA, G.H.; PEDRAZZI, A.H.; SARTI, S.J. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. *J. Ethnopharmacol.*, v. 75, p. 279-282, 2001.
- BAUHMANN, H., GAUDIE, J. The acute phase response. *Immunol. Today*, v. 15, p. 74-80, 1994.
- BENTO, C.A.M.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte emigration induced by plant lectins. *Ag. Actions*, v. 38, p. 48-54, 1993.
- BESSON, M. J.; DICKENSON, A. The pharmacology of pain. Berlin: Springer-Verlag., v.130, p. 21-41, 1997.
- BEUTH, J.; KO, H.L.; PULVERER, G.; UHLENBRUCK, G. Importance of lectins for the prevention of bacterial infection and cancer metastases. *Glycoconjugate J.*, v. 12, p. 1-6, 1995.
- BEVILACQUA, M.P., NELSON, R.M., MANNORI, G. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu. Rev. Med.*, v. 45, p. 361-378, 1994.
- 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, p. 280-6, 2005.
- BOMBINI, G.; CANETTI, C.; ROCHA, F.A.; CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor- α mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 496, p. 197-204, 2004.
- BOURNE, Y.; ROUGE, P.; CAMBILLAU, C. X-ray structure of a biantennary octasaccharide-lectin complex refined at 2.1 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, v. 267, p. 197-203, 1992.

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

BOYDEN, S.; The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.*, v. 115, p. 543-466, 1962

BOYDEN, S.; The chemotactic effect of of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.*, v. 115, p. 543-466. 1962

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

CANETTI, C.A.; SILVA, J.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, v. 134, p. 1619-1628, 2001.

CARDELL, L.O.; AGUSTI, C.; NADEL, J.A. Nitric oxide-dependent neutrophil recruitment: Role in nasal secretion. *Clinical and Experimental Allerg.* v. 30, p. 1799- 1803, 2000.

CARVALHO, J.T.C.; TEIXEIRA, J.R.M.; SOUZA, P.J.C.; BASTOS, J.K.; FILHO, D.S.; SARTI, S.J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *J. Ethnopharm.*, v. 53, p. 175-178, 1996.

CARVALHO, W.A. Mecanismo de ação das drogas antiinflamatórias não-esteróides. I- Ações farmacológicas das prostaglandinas e leucotrienos. *Farmacologia Médica (Br.)*, v. 100, p. 37-44, 1990.

CASALE, T.B.; CAROLAN, E.J. Cytokine-induced sequential migration of neutrophils through endothelium and epithelium. *Inflamm., Res.* v. 48, p. 22-27, 1999.

CAVADA, B.S.; IGLESIAS, M.M.; TRONCOSO, M.F.; TEIXEIRA, E.H.; TURYN, D.; DOMINICI, F.P. Glucose-mannose-binding lectins isolated from Brazilian

beans stimulate the autophosphorylation of the insulin receptor in vitro. *Horm. Metab. Res.*, v. 35, p.125-127, 2003.

CAVAILLON, J.M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: Myth or reality. *Cell. Mol. Biol.*, v. 47, p. 695-702, 2001.

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

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

CHEN, J.C.; CHEN, H.M.; SHRY, M.H.; FAN, L.L.; CHI, T.Y.; CHI, C.P.; CHEN, M.F. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. *J. Formos Med. Assoc.*, v. 99, p. 213–218, 2000.

CHEN, Y.F.; TSAI, H.Y.; WU, T.S. Anti-inflammatory and analgesic activities from root of *Angelica pubescens*. *Planta Med.*, v. 61, p. 2–8, 1995.

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

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, v.32, p. 295-310, 1968.

CONNOR, J.R.; MANNING, P.T.; SETTLE, S.L.; MOORE, W.M.; JEROME, G.M.; WEBBER, R.K.; TJOENG, F.S.; CURRIE, M.G. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 273, p. 15-24, 1995.

CORBETT, J.A.; TILTON, R.G.; CHANG, K.; HASAN, K.S.; IDO, Y.; WANG, J.L.; SWEETLAND, M.A.; LANCASTER, Jr. J.R.; WILLIAMSON, J.R.; Mc DANIEL, M.L. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes*, v. 41, p. 552-556, 1992.

CORREA, C.R.; KYLE, D.J.; CHAKRAVERTY, S. CALIXTO, J.B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin and receptor antagonist NPC 18688 in mice. *Br. J. Pharmacol.*, v. 117, p.552-558, 1996.

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

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

CRONSTEIN, B.N.; WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum.*, v. 136, p.147-157, 1993.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; SAUTEBIN, L.; RIZZO, A.; CRISAFULLI, C.; CAMPO, G.M.; COSTANTINO, G.; CALAPAI, G.; NAVA, F.; DI ROSA, M.; CAPUTI, A.P. Multiple organ failure following zymosan-induced peritonitis is mediated by nitric oxide. *Shock*. v. 8, p. 268-275, 1997.

DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy. *Transplat Immunology*, v. 12, p. 151-157, 2004.

DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*, v. 11, p. 299-306, 2002.

DALTON, S.H.; LONGLEY, R.E.; BIRD, K.T. Hemagglutinins and immunomitogens from marine algae. *J. Mar. Biotechnol.* v. 2, p. 149-155, 1995.

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

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A. *Screens for anti-inflammatory drugs*. J. Pharm. Pharmac., v. 23, p. 297-298, 1971.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. Chest., v. 118, p. 503-508, 2000.

DRISCOLL, K.E.; MAURER, J.K.; HIGGINS, J.; POYNTER, J. Alveolar macrophage cytokine and growth factor production in a rat model of crocidolite-induced pulmonary inflammation and fibrosis. J. Toxicol. Environ. Health., v. 46, p.155-169, 1995.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurologic deficit in rats and mice. J. Neurosci., v.19, p. 3423-3429, 1957.

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

EISERICH, J.P.; PATEL, R.P.; O'DONNELL, V.B.O. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecule. Molec. Aspects Med., v. 19, p. 221-357, 1998.

FACCIOLI, L.H.; NOURSCARGH, S.; MOQBEL, R.; WILLIAMS, F.M.; SEHMI, R.; KAY, A.B.; WILLIAMS, T.J. The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammatory mediators in vivo. Immunology, v. 73, p. 222-227, 1991.

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

FALTAS, B.S.M. Papyrus surgery *Student B.M.J.*, v.12, p.338-339, 2004.

FEIZI, T. Oligosaccharides that mediate mammalian cell-cell adhesion. Curr. Opin. Struct. Biol., v. 3, p. 701-710, 1993.

FELDMANN, M.; PUSEY, C.D. Is there a role for TNF-alpha in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis? Lessons from other chronic inflammatory diseases. J. Am. Soc. Nephrol., v. 17, p. 1243-1252, 2006.

FERREIRA, H.H.A.; MEDEIROS, M.V.; LIMAS, C.S.P.; FLORES, C.A.; SANNOMIYA, P.; AUTUNES, E.; DE NUCCI, G. Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 310, p. 201-207, 1996.

FERREIRA, S.H. Are macrophages the body's alarm cells. *Agents and actions.*, v. 10, p. 229, 1980.

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

FORTES, Z.B.; HYSLOP, S.; DENUCCI, G. Endothelial-derived vascular relaxing factors: role of nitric oxide. In: BRAIN, S.D. & PAGE, C. (Eds.), *Immunopharmacology of the Microcirculation*, Academic Press, New York, p. 16-42, 1994.

FRANCO-PENTEADO, C.F.; DESOUZA, I.; TEIXEIRA, S.A.; RIBEIRO-DA SILVA, G.; NUCCI, G.; ANTUNES, E. Role of nitric oxide on the increased vascular permeability and neutrophil accumulation induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse paw. *Biochem. Pharmacol.*, v. 61, p. 1305-1311, 2001.

FREIRE, M.G.M.; DESOUZA, 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.

FURST, E. D.; MUNSTER, T. Antiflamatórios Não esteroidais Agentes Antireumáticos modificadores da doença, analgésicos não opióides & droga utilizada na Gota. IN: KATZUNG, G. B. *Farmacologia básica e clínica*. 8. ed. Rio de Janeiro Guanabara-Koogan. p. 518, 2003.

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

GADELHA, C.A.; MORENO, F.B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; ROCHA, B.A.; ASSREUY, A.M.; LIMA MOTA, M.R.; PINTO, N.V.; PASSOS

MEIRELES, A.V.; BORGES, J.C.; FREITAS, B.T.; CANDURI, F.; SOUZA, E.P.; DELATORRE, P.; CRIDDLE, D.N.; DE AZEVEDO W.F. JR.; CAVADA, B.S. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. J Struct Biol., v. 152, p. 185-194, 2005.

GARVEY, E.P.; OPLINGER, J.A.; FURFINE, E.S.; KIFF, R.J.; LASZLO, F.; WHITTLE, B.J.; KNOWLES, R.G. 1400W is a slow, tight binding and highly selective inhibitor of inducible oxide nitric synthase in vitro and in vivo. J. Biol. Chem., v. 272, p. 4959-4963, 1997.

GODHWANI, S.; GODHWANI, J.L.; VYAS, O.S. Ocimum sanctum: an experimental study evaluating its anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity in animals. J. Ethnopharm., v. 21, p. 153-163, 1987.

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

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

GRANGER D.N.; BENOIT J.N.; SUZUKI M.; GRISHAM M.B. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia–reperfusion, Am. J. Physiol., v. 257, p. 683-688, 1989.

GRANGER, D.N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. J. Leuk. Biol., v. 55, p. 662-675, 1994.

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

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

GRIFFIS, C.A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. *Biol. Res. Nurs.* v. 7, p. 297-312, 2006.

GUBLER, U.; CHUA, A.O.; BLER, U.; CHUA, A.O.; STERN, A.S.; HELLMANN, C.P.; VITEK, M.P.; DECHIARA, T.M.; BENJAMIN, W.R.; COLLIER, K.J.; DUKOVICH, M.; FAMILLETTI, P.C. Recombinant human interleukin 1 alpha: purification and biological characterization. *J. Immunol.*, v.136, p. 2492-2497, 1986.

GUZMAN, S.; GATO, A.; CALLEJA, J.M. Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytother. Res.*, v. 15, p. 224-230, 2001.

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

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine and Growth Factor Rev.*, v. 13, p. 413-421, 2002.

HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FILHO, J.A.; CORDEIRO, R.B.S. Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz. J. Med. Biolog. Research.*, v. 20, p. 243-249, 1987.

HOLLOWAY, A.F.; RAO, S.; SHANNON, M.F. Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. *Mol. Immunol.*, v. 38, p. 567-580, 2002.

HORI, K.; MATSUBARA, K.; MIYAZAWA, K. Primary structures of two hemagglutinins from the red alga *Hypnea japonica*. *Bioch. Biophys. Acta*, v. 1474, p. 226-236, 2000.

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

HUANG, J.J.; NEWTON, R.C.; RUTLEDGE, S.J.; HORUK, R.; MATTHEW, J.B.; COVINGTON, M.; LIN, Y. Characterization of murine IL-1 beta. Isolation, expression, and purification. *J. Immunol.* v.140, p. 3838-3843, 1988.

HUNSKAAR A.T.; HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v. 30, p. 103–4, 1987.

HUNSKAAR, S.; BERGE, O.G.; HOLE, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behav. Brain Res.*, v.21, p.101-108, 1996.

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

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

HUTTENLOCHER, A.; SANDBORG, R. R. & HORWITZ, A. F. Adhesion in cell migration. *Curr. Opin Cell. Biol.*, v. 7, p. 697-706, 1995.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MAFFIA, P.; SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M. Nitric oxide inhibits leukocyte migration in carrageenan-induced rat pleurisy. *Inflamm. Res.*, v. 49, p. 411–417, 2000.

IGNARRO, L.J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann. Vet. Pharmacol. Toxicol.*, v. 30, p. 535-560, 1990.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 84, p. 9265-9269, 1987.

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

JAIN, N.K.; PATIL, C.S.; KULKARNI, S.K. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Brain Res.*, v. 3, p170-8, 2001.

JENNER, P.; OLANOW, C.W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*. v. 47, p. 161-170, 1996.

JOLY, AB. Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo*, v. 21, p. 1-393, 1965.

JONES, A.K.; AL-JANABI, M.A.; SOLANKI, K.; SOBNACK, R.; GREENWOOD, A.; DOYLE, D.V.; BRITTON, K.E.; HUSKISSON, E.C. *In vivo* leukocyte migration in arthritis. *Arthritis Rheum*. v. 34, p. 270–275, 1991.

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

KANSAS, G.S. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. *Blood*. v. 88, p. 3259-3287, 1996.

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

KEEBLE, J.E.; MOORE, P.K. Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs. *Br. J. Pharmacol*. v. 137, 295-310, 2002.

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

KLEHA, J. F.; DEVESLY, P.; JOHNS, A. The effects of lectins on the release of EDRF from rabbit aorta. *Br. J. Pharmacol.*, v. 104, p. 287-288, 1991

KNOL, E.F.; TACKEY, F.; TEDDER, T.F.; KLUNK, D.A.; BICKEL, C.A.; STERBINSKY, S.A.; BOCHNER, B.S. Comparison of human eosinophil and neutrophil adhesion to endothelial cells under nonstatic conditions. Role of L-selectin. *J. Immunol.*, v. 153, p. 2161-2167, 1994.

KÖNIG, G.M.; WRIGHT, A.D. Marine natural products research: current directions and future potential. *Plant Medic.*, v. 62, p. 193-211, 1996.

KOSONEM, O.; KANKAANRANTA, H.; UOTILA, J.; MOILANEM, E. Inhibition by nitric oxide-releasing compounds of E-selectin expression in neutrophil adhesion to human endothelial cells. *Eur. J. Pharmac.*, v. 394, p. 149-156, 2000.

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

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Nitric Oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 88, p. 4651-4655, 1991.

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

LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; DONATO, J.L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; De NUCCI, G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw edema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. *Br. J. of Pharmacol.*, v. 114, p. 578-583, 1995.

LANSEN, G.L.; HENSON, P.M. Mediators of inflammation. *Rev. Immunol.*, v. 1, p. 335-359, 1993.

LASZLO, F.; EVANS, S.M.; WHITTLE, B.J.R. Aminoguanidin inhibits both constitutive and inducible oxide nitric synthase isoforms in rat intestinal microvaculature in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 272, p. 169-175, 1995.

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

LEE, R.E. *Phycology*. 2th ed. Cambridge University Press, New Youk, NY 10011-4211, USA, 1997.

- LENT, R. Cem bilhões de Neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: Editora Atheneu. p.2-239, 2004.
- LEVINE, J.D.; TAIWO, Y. Inflammatory Pain. Em: Wall, P.D., Melzack, R. Textbook of Pain, 3a Ed, Edinburgh, Churchill Livingtone, p. 45-56, 1994.
- LEY, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. Immunol. Rev., v. 186, p. 8-18, 2002.
- LIAUDET, L.; SORIANO, F.G.; SZABÓ, C. Biology of nitric oxide signaling. Critic. Care Med., v. 26, p. 37-52, 2000.
- LIM, S.N.; CHEUNG, P.C.; OOI, V.E.; ANG, P.O. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed *Sargassum siliquastrum*. J. Agric. Food Chem., v. 50, p. 3862-3866, 2002.
- LIMA, R.F.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E.P.; SAMPAIO, A.H.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, A.M. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. J. Pharm Pharmacol., v. 56, p. 1415-1421, 2004.
- LO, T.N.; ALMEIDA, A.P.; BEAVEN, M.A. Dextran and carrageenin evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. J. Pharmacol., Exp. Ther. v. 221, p. 261-267, 1982.
- LOTAN, R.; RAZ, A. Endogenous lectins as mediators of tumor cell adhesion. J. Cell Biochem., v. 37, p. 107-117, 1988.
- MACIEL, E.V.; ARAUJO-FILHO, V.S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y.M.; COELHO, L.C.; CORREIA, M.T. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. Biologicals, v. 32, p. 57-60, 2004.
- MALECH, H.L.; GALLIN, J.I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. N. Engl. J. Med., v. 317, p. 687-694, 1987.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis inconscious rats. Br. J. Pharmacol., v. 114, p. 1069-1075, 1995.

MANNORI, G.; CROTTET, P.; CECCONI, O.; HANASAKI, K.; ARUFFO, A.; NELSON, R.M.; VARKI, A.; BEVILACQUA, M.P. Differential Colon Cancer Cell Adhesion to E-, P-, and L-selectin: Role of Mucin type-Glycoproteins. *Cancer Research*, v. 55, p. 4425-4431, 1995.

MAYHAN, W.G. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheeks pouch in response to adenosine 5-diphosphate and bradykinin. *Inflammation*, v 16, p. 295-305, 1992.

McCARTNEY-FRANCIS, N.L.; ALLEN, J.B.; MIZEL, D.E.; ALBINA, J.E.; XIE, Q.W.; NATHAN, C.F.; WAHL, S.M. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.*, v. 178 p. 749-754, 1993.

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

McEVER, R.P. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v. 4, p. 840-849, 1992.

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

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

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

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.*, v. 57, p. 1-64, 1999.

MILLER, M.R.; MEGSON, I.L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br. J. Pharmacol.*, v. 151, p. 305-321, 2007.

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

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

MONTENEGRO, M.R., FRANCO, M. *Patologia Processo gerais*. São Paulo: Atheneu, p. 233, 1999.

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, p. 211-218, 1991.

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

MUKHERJEE, D. Selective Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor and potential risk of cardiovascular events. *Biochem. Pharmacol.*, v. 63, p. 817-821, 2002.

NAGANO, C.S.; DEBRAY H., NASCIMENTO, K.S.; PINTO V.P.T.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, S.S.; FARIAS, W.R.L.; SAMPAIO, A.H.; CALVETE, J.J. HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. *Protein Science*, v.14, p. 2167-2176, 2005a.

NAGANO, C.S.; GALLEGRO, DEL SOL F.; CAVADA, B.S.; NASCIMENTO, K.S.; NUNES, E.V.; SAMPAIO, A.H.; CALVETE, J.J. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of HML, a lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. *Acta Crystallograph. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, v. 61, p. 997-999, 2005b.

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*. *Prot. Pept. Lett.*, v. 9, p. 159-165, 2002.

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

NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; NUNES, E.V.; RODRIGUES, R.F.; GOERSCH, G.V.; CAVADA, B.S.; CALVETE, J.J.; SAKER-SAMPAIO S.; FARIAS, W.R.; SAMPAIO, A.H. Isolation and characterization of a new agglutinin from the red marine algae *Hypnea cervicornis* J. Agardh. *Biochem. Cell. Biol.*, v. 84, p. 49-54, 2006.

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

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

NEVES, S.A.; FREITAS, A.L.P.; SOUZA, B.W.S.; ROCHA, M.L.A.; CORREIA, M.V.O.; SAMPAIO, D.A.; VIANA, G.S.B. Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 40, p. 127-134, 2007.

NIKI, Y.; YAMADA, H.; SEKI, S.; KIKUCHI, T.; TAKAISHI, H.; TOYAMA, Y.; FUJIKAWA K.; TADA, N. Macrophage- and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1 alpha transgenic mice. *J. Clin. Invest.*, v.107, p.1127-1135, 2001.

NORTHOVER, A.M.; NORTHOVER, B.J. Lectin-induced increase in microvascular permeability to colloidal carbon *in vitro* may involve protein kinase C activation. *Ag. Actions.*, v. 42, p. 136-139, 1994.

OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. *Brain Research.* v.787,p.161-164,1998.

OPPENHEIM, J.J. Cytokines: Past, present, and future. *Int. J. of Hematol.*, v. 74, p. 3-8, 2001.

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

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v. 327, p. 524-526, 1987.

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

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. *Lancet.*, v. 357, p. 1777-1789, 2001.

PARRATT, J.R.; WEST, G.B. Inhibition by various substances of edema formation in the hind-paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, dextran, egg-white and compound 48/80. *Br. J. Pharmacol.*, v. 13, p. 65-70, 1958.

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

PELLETIER, J.P.; JOVANOVIĆ, D.V.; LASCAU-COMAN, V.; FERNANDES, J.C. ; MANNING, P.T. ; CONNOR, J.R. ; CURRIE, M.G. ; MARTEL-PELLETIER, J. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum.*, v. 43, p. 1290-1299, 2000.

PELLETIER, J.P.; LASCAU-COMAN, V. ; JOVANOVIĆ, D. ; FERNANDES, J.C. ; MANNING, P. ; CONNOR, J.R. ; CURRIE, M.G. ; MARTEL-PELLETIER, J. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J. Rheumatol.*, v. 26, p. 2002-2014, 1999.

- PERRETTI, M.E.R.; FLOWER, J. Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. *J. Immunol.*, v. 150, p. 992-999, 1993.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, v. 109, p. 347-352, 1995.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. In: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 15, p. 199-228, 1998.
- PHILIP, M.; ROWLEY, D.A.; SCHEREIBER, H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. In: *Seminars in Cancer Biology*, v.14, p. 433-439, 2004.
- RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. *Curr. Opin. Neurobiol.* v.12, p.195-204, 2002.
- RAMOS, M.V., MOREIRA, R.A., CAVADA, B.S OLIVEIRA, J.T.A. and ROUGÉ, P. Interaction of the lectins from sub-tribe Diocleinae with specific ligands. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, v. 8, p. 193-199, 1996.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Pharmacology*. 5^a ed., Elsevier, 2003.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHOM, S.E. *Biology of plants*. 5^a ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, p. 735, 1996.
- REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; SCHULZ, R.; HODSON, H.F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, v. 101, p. 746-752, 1990.
- RHODIN J.A.G. Architecture of the vessel wall, in: D.F. Bohr, A.P. Somlyo, H.V. Sparks (Eds.), *Handbook of Physiology: The Cardiovascular System*, Bethesda, v. II, p. Md 1–31, 1986.
- RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. IL-8 cause in vivo neutrophil migration by a cell dependent mechanism. *Immunology*, v. 73, p. 472-477, 1991.

RIBEIRO, R.A.; SOUZA-FILHO, M.V.P.; SOUZA, M.H.L.P.; OLIVEIRA, S.H.P.; COSTA, C.H.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.P. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, v. 112, p. 27-35, 1996.

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

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. *As Bases Patológicas das Doenças. Cap 3: Inflamação e reparo.* 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.48-79, 2005.

ROCHA, J.C.S.; PEIXOTO, M.E.B.; JANCAR, S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A.; ROCHA, F.A.C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *Br. J. Pharmacol.*, v. 136, p. 588-596, 2002.

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

ROSEN, S.D.; BERTOZZI, C.R. The selectins and their ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 6, p. 663-673, 1994.

ROSSITER, H.; ALON, R.; KUPPER, T.S. Selectins, T-cell rolling and inflammation. *Molecular Med Today*, p. 214-222, 1997.

SALEH, T.S.F; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*, v. 20, p. 949-956, 1999.

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

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

SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachycinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides*, v. 31, p. 381-389, 1997.

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

SCAPIGLIATI, G.; BOSSU, P.; CENSINI, S.; TAGLIABUE, A.; BORASCHI, D.; GHIARA, P. Quantitation of biologically active IL-1 by a sensitive assay based on immobilized human IL-1 receptor type II (IL-1RII). *J. Immunol. Methods.*, v.138, p.31-38, 1991.

SCHAAF-LAFONTAINE, N.; HOOGHE, R. J.; PLAETSE, F.V. Modification of blood-borne arrest properties of lymphoma cells by inhibitors of protein glycosylation suggests the existence of endogenous lectins. *Carbohydrate Res.*, v. 138, p. 315-323, 1985.

SECCO, D.D.; MOREIRA, A.P.; FREITAS, A.; SILVA, J.S.; ROSSI, M.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. *Nitric Oxide*, v. 15, p. 77-81, 2006.

SECCO, D.D.; PARON, J.A.; De OLIVEIRA, S.H.P.; FERREIRA, S.H.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide*, v. 9, p. 153-164, 2004.

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

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

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

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

SIDDQUII, S.; SHYUM, S.B.N.; USMANGHANI, K.; SHAMEEL, M. Antibacterial Activity and Fatty Acid Composition of the Extract from *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta). *Pak. J. Pharm. Sci.*, v. 6, p. 45-51, 1993.

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

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

SINGH, R.S.; TIWARY, K.; KENNEDY, J. F. Lectins: sources, activities and applications. *Crit. Rev. in Biotech.*, v. 19 (2), p. 145-178, 1999.

SIQUEIRA, J.R.; DANTAS, C.J.S. Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação. Rio de Janeiro: Medsi, p. 238, 2000.

SMEETS, R.L.; JOOSTEN, L.A.; ARNTZ, O.J.; BENNINK, M.B.; TAKAHASHI, N.; CARLSEN, H.; MARTIN, M.U.; VAN DEN BERG, W.B.; VAN DE LOO, F.A. Soluble interleukin-1 receptor accessory protein ameliorates collagen-induced arthritis by a different mode of action from that of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum.*, v. 52, p. 2202–2211, 2005.

SODHI, A.; TARANG, S.; KESHERWANI, V. Concanavalin A induced expression of Toll-like receptors in murine peritoneal macrophages in vitro. *Int Immunopharmacol.*, v. 7, p. 454-463, 2007.

SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S.H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. *Agents Actions*, v. 24, p. 377-380, 1988.

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

SRINIVASAN, K.; MURUGANANDAN, S.; LAL, J.; CHANDRA, S.; TANDAN, S.K.; PRAKASH, V.R. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Pongamia pinnata* leaves in rats. *J. Ethnopharm.*, v. 78, p. 151-157, 2001.

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

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

TAYLOR, P.C.; WILLIAMS, R.O.; FELDMANN, M. Tumour necrosis factor alpha as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. *Curr Opin Biotechnol.*, v. 15, p. 557-563, 2004.

TAYLOR, W.R. *Marine Algae of the Eastern Tropical and Sub-Tropical Coast of Americas*. Ann Harbor: The University of Michigan Press, 879, 1960.

TEDDER, T.F.; STEEBER, D. A.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J.*, v. 9, p. 866-873, 1995.

TEDGUI, M.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circul. Res.*, v. 88, p. 877-887, 2001.

TEIXEIRA, M.M.; WILLIAMS, T.J.; HELLEWELL, P.G. E-type prostaglandins enhance local oedema formation and neutrophil accumulation but suppress eosinophil accumulation in guinea pig skin. *Br. J. Pharmacol.*, v. 110, p. 416-422, 1993.

THIERMERMANN, C.; VANE, J. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 182, p. 591-595, 1990.

TITHERADGE, M.A. Nitric oxide in septic shock. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1411, p. 437-455, 1999.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, v.51, p.5-17, 1992.

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

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

TYSON, J.J.; CHEN, K.; NOVAK, B. Network dynamics and cell physiology. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 2, p. 908-916, 2001.

VALE, L.M.; ROLIM, D.E.; CAVALCANTE, I.F.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.; Role of NO/cGMP/K(ATP) pathway in the antinociceptive effect of sildenafil in zymosan writhing response in mice. *Inflamm. Res.*, v. 56, p.83-88, 2007.

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

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Prostaglandins and cyclooxygenases in spinal cord. *Prog. Neurobiol.*, v.64, p.327-363, 2001.

VIANA, G.S.B.; FREITAS, A.L.P.; LIMA, M.M.L.; VIEIRA, L.A.P.; ANDRADE, M.C.H.; BENEVIDES, N.M.B. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates

from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 35, p. 713-722, 2002.

VIEIRA, L.A.P.; FREITAS, A.L.P.; FEITOSA, J.P.A.; SILVA, D.C.; VIANA, G.S.B. The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 37, p. 1071-1079, 2004.

WHITE, M. Mediator of inflammation and the inflammatory process. J. Allergy Clin. Immunol., v. 103, p. 378-381, 1999.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of rats as an assay method for antiinflammatory drugs. Proceedings of the society experimental biology and medicine, v. 111, p 544-547, 1962.

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

WOOD, J.N. & DOCHERTY, R. Chemical activators of sensory neurons. Ann. Rev. Physiol., v. 59, p. 457-482, 1997.

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

YOSHIKAY, Y. Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection. Current opinion infectious Diseases, v. 14, p. 257-263, 2001.

YOUSIF, M.H.M. Histamine-induced vasodilation in the perfused kidney of STZ diabetic rats: Role of EDNO and EDHF. Pharmacol. Res., v. 51 p. 515-521, 2005.

ZHANG, L.; HSU, C. H.; ROBINSON, C. P. Effects of ricin administration to rabbits on the ability of their coronary arteries to contract and relax in vitro. Toxicol. Appl. Pharmacol., v. 129, p. 16-22, 1994.