



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

PATRÍCIA BASTOS LUZ

**EFEITO PROTETOR DA LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* NA
PANCREATITE AGUDA INDUZIDA POR CERULEÍNA EM CAMUNDONGOS VIA
MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO**

FORTALEZA

2017

PATRÍCIA BASTOS LUZ

**EFEITO PROTETOR DA LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* NA
PANCREATITE AGUDA INDUZIDA POR CERULEÍNA EM CAMUNDONGOS VIA
MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Ciências biológicas II.

Orientador: Nylane Maria Nunes de Alencar

FORTALEZA

2017

PATRÍCIA BASTOS LUZ

**EFEITO PROTETOR DA LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* NA
PANCREATITE AGUDA INDUZIDA POR CERULEÍNA EM CAMUNDONGOS VIA
MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Ciências biológicas II.

Orientador: Nylane Maria Nunes de Alencar

Aprovada em: 03/02//2017.

Profª Drª Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª Drª Flávia Almeida Santos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof Dr Pedro Marcos Gomes Soares
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª Drª Ilka Maria Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª Drª Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L994e Luz, Patrícia Bastos.
EFEITO PROTETOR DA LECTINA DE SEMENTES DE Moringa oleífera NA
PANCREATITE AGUDA INDUZIDA POR CERULEÍNA EM CAMUNDONGOS VIA
MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO / Patrícia Bastos Luz. – 2017.
132 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

1. Moringa oleífera. Pancreatite aguda. Neutrófilos. Cálcio.. I. Título.

CDD 615.1

A Deus por ter me concedido saúde até os dias de hoje, guiando-me pelos melhores caminhos.

Aos meus pais, Margarida e Zacarias, pela absoluta confiança e inquestionável apoio em todas as minhas escolhas desta vida.

Aos meus irmãos, Ana Beatriz e Paulo Victor, por serem um porto seguro a qualquer momento da minha vida.

À Camila e Bárbara, por me presentear com momentos leves e cheios de carinho.

Ao meu grande amor, Lucas, por total incentivo, dedicação e companheirismo.

Definem o amor.

A vocês, eu dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar paz interior e equilíbrio diante das situações adversas. Sem Ele este momento não seria possível.

À minha mãe, Margarida, por ser exemplo de dedicação à família. Por sempre me confortar nos momentos difíceis. À minha irmã, Bia, por ser tão amiga, generosa e super paciente comigo. Minhas fiéis companheiras, sem vocês a caminhada seria quase impossível. Ao meu pai, Zacarias, por sempre ter priorizado meus estudos, pelo carinho e pelos seus conselhos de vida. Ao meu irmão, Paulo Victor pela amizade e apoio. À minha “cunhada-irmã”, Camila, por ser tão prestativa e bondosa. À minha sobrinha linda, Babinha, por alegrar e tornar os meus dias mais leves. Amo vocês.

Ao meu querido amor, Lucas, por me apresentar a felicidade nos mais simples momentos e por ser meu maior exemplo de bondade. Aos meus queridos sogros, Sr. Deoclécio e Dona Áurea, por me acolherem com tanto carinho em sua casa e por total incentivo neste momento. Amo vocês.

À minha orientadora, Prof^a Nylane Maria Nunes de Alencar, por dispor seu conhecimento e experiência ao longo desta orientação. Por seu constante apoio, confiança e amizade. Agradeço às inúmeras oportunidades acadêmicas oferecidas e por todo seu carinho nestes sete anos de ótima convivência. Serei eternamente grata.

À Prof^a Dr^a Ilka Maria Vasconcelos e ao seu grupo de pesquisa, pelo fornecimento da proteína colaborando com este trabalho;

Aos Professores Doutores, Flávia Almeida Santos, Pedro Marcos Gomes Soares, Ilka Maria Vasconcelos e Ana Maria Sampaio Assreuy por terem aceitado o convite de integrar a banca examinadora desta tese, contribuindo substancialmente para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Doutor David Criddle da Universidade de Liverpool, pela enorme contribuição neste trabalho, com sugestões, discussões e conhecimentos. Por ter sido um anjo em toda a minha estadia em Liverpool. Serei eternamente grata.

Ao professor Alexei Tepikin da Universidade de Liverpool, por total disponibilidade para discussão dos dados deste trabalho, pela presença constante e ótimo humor no laboratório.

Às meninas dos laboratórios LPN e LEFFAG, Tuelly, Ana Flávia e Samara que me auxiliaram com importantes abordagens experimentais neste trabalho.

Às grandes companheiras de Lab., Larisse Marques e Rachel Sindeaux pela amizade verdadeira, pelo auxílio nos experimentos e por compartilharem momentos difíceis e alegres dessa nossa longa trajetória acadêmica. Aprendi muito com vocês nestes sete anos de convivência.

À família do Lab. Bioquímica-Farmacologia: Larisse Marques, Rachel Sindeaux, Luana David, Tamires Goebel, Ingrid Samantha, Patrícia Sâmara, Manoel Serra Azul, Gisele de Fátima, Yuri Tayro, Kálian e Marília pela convivência tão saudável e por estarem sempre dispostos a ajudar. Tenho muito orgulho de fazer parte desta família. Este trabalho é nosso! Obrigada, meus queridos amigos, contem sempre comigo.

Aos ICs super queridos, Gisele e Yuri, por todo empenho e dedicação ao nosso Lab. e por estarem presentes na maioria dos experimentos deste trabalho. Vocês foram fundamentais. Espero ter contribuído e incentivado de alguma forma a seguirem a árdua e prazerosa carreira acadêmica. Muito obrigada!

Ao meu grande amigo Flávio Bitencourt, por estar sempre ao meu lado quando preciso, pela sua simplicidade e paz que me fazem muito bem. À minha amiga Mirella Pereira, por ter participado deste trabalho e por ser uma pessoa tão alegre, leve e positiva. À minha amiga Lílian, por fazer questão de participar de todos os momentos da minha vida. Muito grata por ter pessoas tão generosas ao meu lado.

Aos amigos de Liverpool que me acolheram tão bem e tornaram minha estadia ainda mais prazerosa. Foram verdadeiros companheiros enquanto eu estive longe de casa e me auxiliaram bastante nos experimentos. Yulin Ouyang, Svetlana Veronina, Nikheele, Peter Szatmary, Helen Tanton, Wei Huang, Tony e Emily. Thanks, Blue Block and PBRU!

A todos os docentes do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, pela contribuição para com a minha formação científica. Às secretárias da Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Célia e Laura, por sempre estarem dispostas a nos atender tão bem.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

Meu muito obrigada!

RESUMO

EFEITO PROTETOR DA LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* NA PANCREATITE AGUDA INDUZIDA POR CERULEÍNA EM CAMUNDONGOS VIA MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO

Pancreatite aguda (PA) é uma doença inflamatória que acomete primariamente o pâncreas, podendo evoluir com insuficiência de múltiplos órgãos, tais como pulmão e fígado. Apesar da sua significativa taxa de morbidade e mortalidade, ainda não há alternativas terapêuticas para a cura da PA. *Moringa oleifera* é uma planta originária da Ásia, da África e da América do Sul com ampla ocorrência no nordeste brasileiro é largamente utilizada na medicina popular. A MoCBP4 é uma lectina purificada a partir das sementes de *M. oleifera* com comprovadas atividades anti-inflamatória e antinociceptiva. No presente estudo, foi avaliado o efeito da MoCBP4 sobre as alterações funcionais, inflamatórias e moleculares características da PA em modelos *in vivo* e *in vitro*. Camundongos foram tratados com MoCBP4 nas doses de 20, 40 e 80 mg/kg por via oral e após 1 hora receberam cinco injeções de ceruleína (50µg/kg) por via intraperitoneal com intervalos de 1 hora entre as administrações. A eutanásia dos animais ocorreu após 6 horas da última administração de ceruleína e o pâncreas, pulmão, fígado e sangue foram coletados para avaliação do edema pancreático, amilase, lipase, AST, ALT, atividade de MPO, TNF- α , IL-1 β , IL-6, NP-SH, MDA, NO $_2^-$, COX-2, NF κ B e NOSi, além das análises histológicas. Alterações dos níveis de Ca $^{2+}$ citosólico foram mensuradas em células acinares do pâncreas de camundongos estimuladas por colecistocinina-8 (CCK). Foram avaliados os efeitos da MoCBP4 sobre a necrose de células acinares induzida por TLC-S e sobre a produção de EROsem neutrófilos isolados da medula óssea estimulados por fMLP e PMA. Para estatística foi utilizado ANOVA/Teste de Newman-Keuls ou Kruskal Wallis/Teste de Dunn. P<0,05 foi aceito. MoCBP4 (20, 40 e 80 mg/kg) reduziu, respectivamente, o edema pancreático (13%, 21% e 41%); amilase (18%, 14% e 28%); lipase (51%, 39% e 33%); AST (42%, 47% e 36%); ALT (30%, 50%, 37%); atividade de MPO no pâncreas (58%, 51% e 43%), no pulmão (42%, 56% e 42%) e no fígado (51%, 66% e 56%). Na análise histológica, MoCBP4 na dose de 40mg/kg foi capaz de atenuar significativamente o infiltrado inflamatório e a necrose no pâncreas, além de reduzir danos pulmonar e hepático. MoCBP4 (40 mg/kg) diminuiu os níveis pancreáticos das

citocinas TNF- α , IL1- β e IL-6 (40%, 55% e 67%) e também os níveis plasmáticos de TNF- α , IL1- β (68% e 63%); aumentou os níveis plasmáticos de NP-SH e reduziu significativamente MDA e NO₂⁻ no plasma. MoCBP4 (40 mg/kg) reduziu a imunomarcagem de COX-2, TNF- α , iNOS e NF- κ B no pâncreas. Em células acinares estimuladas por CCK, MoCBP4 (1 μ M) reduziu os níveis sustentados de Ca²⁺ citosólico. MoCBP4 (1 μ M) atenuou a necrose de células acinares induzida por TLC-S em 73%. MoCBP4 (10 μ M) atenuou a produção de EROs em neutrófilos estimuladas por fMLP (59%) e PMA (58%). Estes dados reunidos evidenciam que MoCBP4 protege contra a pancreatite aguda edematosa induzida por ceruleína, sendo este efeito associado à atenuação da resposta inflamatória local e sistêmica intermediada por redução dos neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias, bem como pelo estresse oxidativo e lesão tecidual. Em células isoladas, MoCBP4 foi capaz de atenuar a ativação de neutrófilos, além de reduzir o aumento global e sustentado de Ca²⁺ no citosol de células acinares e, provavelmente, por esta razão, reduziu a morte celular por necrose.

Palavras chaves: *Moringa oleífera*. Pancreatite aguda. Neutrófilos. Cálcio.

ABSTRACT

PROTECTIVE EFFECT OF LECTIN OF SEEDS OF *Moringa oleifera* IN ACUTE PANCREATITIS INDUCED BY CERULEIN IN MICE VIA MODULATION OF INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS

Acute pancreatitis (AP) is an inflammatory disease that primarily affects the pancreas, and can progress with insufficiency of many organs, such as lung and liver. Despite its significant morbidity and mortality rate, there are not therapeutic alternatives for PA cure. *Moringa oleifera* is a plant native to Asia, Africa and South America, with extensive expansion into the Brazilian Northeast and widely used in folk medicine. MoCBP4 is a lectin purified from *M. oleifera* seeds with anti-inflammatory and antinociceptive activities. The present study aimed to evaluate the effect of MoCBP4 on the functional, inflammatory and molecular alterations characteristic of PA *in vivo* and *in vitro* models. Mice were treated orally with MoCBP4 at doses 20, 40 and 80 mg/kg and after 1 hour they received five injections of cerulein (50 µg/kg) intraperitoneally at 1-hour intervals between administrations. The animals were euthanized after 6 hours of the last administration of cerulein. The pancreas, lung, liver and blood were collected to evaluate the pancreatic edema, amylase, lipase, AST, ALT, MPO activity, TNF-α, IL-1β, IL-6, NP-SH, MDA, NO²⁻, COX-2, NF-κB and NOSi, in addition to histological analysis. Cytosolic Ca²⁺ levels were measured in acinar cells stimulated by cholecystokinin-8 (CCK). The effects of MoCBP4 were evaluated on TLC-S-induced acinar cell necrosis and on FMLP and PMA-stimulated neutrophils production of ROS. The statistical analyses were performed using analysis of variance followed by the Newman-Keuls or Kruskal Wallis/Dunn *post hoc* test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. MoCBP4 (20, 40 and 80 mg / kg) reduced, respectively, pancreatic edema (13%, 21% and 41%); amylase (18%, 14% and 28%); lipase (51%, 39% and 33%); AST (42%, 47% and 36%); ALT (30%, 50%, 37%); MPO activity in the pancreas (58%, 51% and 43%), lung (42%, 56% and 42%) and liver (51%, 66% and 56%). In the histological analysis, MoCBP4 at dose of 40mg / kg was able to significantly attenuate the inflammatory infiltrate and necrosis in the pancreas, besides reducing lung and hepatic damage. MoCBP4 (40 mg/kg) decreased the pancreatic levels of TNF-α, IL1-β and IL-6 (40%, 55% and 67%) and also reduced plasma levels of TNF-α and IL1-β (68% and 63%); MoCBP4 (40 mg/kg) increased plasma levels of NP-SH

and significantly reduced MDA and NO²⁻. MoCBP4 (40 mg / kg) reduced the pancreatic immunostaining of COX-2, TNF- α , iNOS and NF- κ B. MoCBP4 at concentration 1 μ M reduced sustained levels of cytosolic Ca²⁺ on the acinar cells stimulated by CCK . MoCBP4 (1 μ M) attenuated TLC-S-induced acinar cell necrosis in 73%. MoCBP4 (10 μ M) attenuated ROS production by neutrophils stimulated by fMLP (59%) and PMA (58%). These data show that MoCBP4 protects against acute edematous pancreatitis induced by cerulein, and this effect is associated with attenuation of local and systemic inflammatory response mediated by reduction of neutrophils and pro-inflammatory cytokines, as well as oxidative stress and tissue injury. In isolated cells, MoCBP4 was able to attenuate neutrophil activation, in addition to reducing overall and sustained of Ca²⁺ in the acinar cell cytosol and, probably for this reason, reduced cell death by necrosis.

Keywords: *Moringa oleifera*. Acute pancreatitis. Neutrophils. Calcium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localização anatômica do pâncreas humano	21
Figura 2	(A) Porções distintas do pâncreas, (B) detalhes da disposição dos ácinos e (C) célula acinar	22
Figura 3	Função regulatória dos neutrófilos sobre a ativação do tripsinogênio na fase tardia da pancreatite	27
Figura 4	(A) Árvore de <i>M. oleifera</i> ; (B) Frutos imaturos; (C) Frutos maduros; (D) Sementes aladas.	38
Figura 5	Esquema de tratamento dos animais no modelo de pancreatite aguda induzida por ceruleína	53
Figura 6	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MoCBP4) reduz atividade plasmática da amilase (A) e lipase (B) em resposta à administração da ceruleína em camundongos com pancreatite aguda	66
Figura 7	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MoCBP4) reduz atividades plasmáticas de AST (A) e ALT (B) em resposta à administração da ceruleína em camundongos com pancreatite aguda	67
Figura 8	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MoCBP4) reduz o edema pancreático causado por ceruleína em camundongos	68
Figura 9	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MoCBP4) reduz a atividade da mieloperoxidase (MPO) no pâncreas, pulmão e fígado de camundongos com pancreatite aguda	69
Figura 10	A lectina MoCBP4 reduziu a produção de EROs por neutrófilos estimulados por fMLP e PMA	70
Figura 11	Fotomicrografias representativas do tecido pancreático de camundongos com pancreatite aguda induzida por ceruleína	72
Figura 12	Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos com pancreatite aguda induzida por ceruleína	74
Figura 13	Fotomicrografias representativas do tecido hepático de camundongos com pancreatite aguda induzida por ceruleína	75
Figura 14	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i>	

	(MoCBP4) reduz as concentrações plasmáticas e pancreáticas das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) em camundongos com pancreatite aguda	77
Figura 15	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MoCBP4) aumenta concentração de NP-SH e reduz níveis de MDA no pâncreas de camundongos com pancreatite aguda	78
Figura 16	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MoCBP4) reduz níveis de nitrito plasmático e pancreáticos em camundongos com pancreatite aguda	79
Figura 17	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MoCBP4) reduziu a imunomarcagem de COX-2 no pâncreas de camundongos com pancreatite aguda	80
Figura 18	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MoCBP4) reduziu a imunomarcagem de TNF α no pâncreas de camundongos com pancreatite aguda	81
Figura 19	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MoCBP4) reduziu a imunofluorescência de iNOS no pâncreas de camundongos com pancreatite aguda	83
Figura 20	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MoCBP4) reduziu a imunofluorescência de NF- κ B no núcleo das células acinares do pâncreas de camundongos com pancreatite aguda	84
Figura 21	Efeito MoCBP4 sobre a concentração do íon cálcio citosólico ($[Ca^{2+}]_c$) em células acinares isoladas estimuladas por colecistocinina-8 (CCK)	86
Figura 22	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MoCBP4) reduz necrose induzida por TLC-S em células acinares pancreáticas de camundongos	88
Figura 23	Modelo hipotético para a ação da MoCBP4 na pancreatite aguda experimental e sobre células acinares	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (MoCBP4) preveniu alterações histológicas no pâncreas de camundongos com pancreatite aguda induzida por ceruleína.	73
-----------	--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato aminotrasferase
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Íon cálcio
CCK	Colecistocinina 8
CEPA	Comissão de Ética de Pesquisa em Animais
COX-2	Ciclooxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
e.v.	Endovenosa
Elisa	Enzyme-linked immunosorbent assay
EROS	Espécies reativas de oxigênio
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
g	Gramma
GSH	Glutathiona reduzida
h	Hora
HE	Hematoxilina-Eosina
HRP	“Horseradish” peroxidase
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.p.	Intraperitoneal
ICAM-1 =	Molécula 1 de adesão intercelular
IFN- α ou γ	Interferon alfa ou gama
IL-10	Interleucina-10
IL-1 β	Interleucina-1 tipo beta
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase
KDa	Kilodaltons
kg	Kilograma
L	litro

MDA	Malonaldeído
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
MoCPB4	<i>Moringa oleifera</i> – Chitin Binding Protein
MPO	Mieloperoxidase
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-YI]-2,5-Diphenyl TetrazoliumBromide
NF-κB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
nmol	Nanomol
NO	Óxido nítrico
NO ²⁻	Nitrito
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
NP-SH	Grupo sulfidril não proteico
°C =	Grau centígrado
p =	Significância
PA	Pancreatite aguda
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PBS	Solução tamponada com fosfato
PGE ₂	Prostaglandina-2
PGs	Prostaglandinas
PMA	Acetato de miristato de forbol
rpm =	Rotações por minuto
s	Segundo
s.c.	Subcutânea
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tiobarbitúrico
TLC-S	Ácido taurolitocólico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
U	Unidades
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1. Pâncreas	21
2.2. Pancreatite Aguda	23
2.3. Modelo de pancreatite aguda por ceruleína	29
2.4. Lectinas: definição e breve histórico	30
2.5. Lectinas vegetais	31
2.6. Efeitos biológicos das lectinas vegetais	34
2.7. <i>Moringa oleífera</i> Lamark: considerações gerais	37
2.8. Efeitos biológicos da <i>Moringa oleífera</i>	39
2.9. MoCBP4: <i>Moringa oleífera</i> – Chitin Binding Protein	41
3. JUSTIFICATIVA	44
4. OBJETIVOS	46
4.1. Objetivo geral	46
4.2. Objetivos específicos	46
5. MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1. Purificação da MoCBP4	48
5.2. Animais experimentais	49
5.3. Fármacos e Reagentes	49
5.4. Equipamentos e materiais	51
5.5. Indução da pancreatite aguda por ceruleína em camundongos.	52
5.6. Grupos experimentais e protocolos de tratamento	53
5.7. Parâmetros avaliados no modelo <i>in vivo</i>	54
5.7.1. Determinação das atividades plasmáticas das enzimas amilase, lipase, AST e ALT	54
5.7.2. Determinação do edema pancreático	54
5.7.3. Determinação da mieloperoxidase no pâncreas, pulmão e fígado	54
5.7.4. Análise histológica do pâncreas, pulmão e fígado	55
5.7.5. Dosagem de citocinas no plasma e no pâncreas	55
5.7.6. Quantificação de marcadores do estresse oxidativo no pâncreas.	56
5.7.7. Quantificação de nitrito no plasma e no pâncreas	57
5.7.8. Imunomarcção de COX-2 e TNF- α no pâncreas por imunohistoquímica	58
5.7.9. Imunomarcção de iNOS e NF- κ B no pâncreas por imunofluorescência	59
5.8. Parâmetros avaliados <i>in vitro</i>	60
5.8.1. Isolamento das células acinares a partir do pâncreas decamundongos	60
5.8.2. Isolamento de neutrófilos a partir da medula óssea	60

decamundongos	
5.8.3. Análise dos níveis de Ca ²⁺ no citosol de células acinares estimuladas por colecistocinina-8 (CCK)	61
5.8.4. Avaliação da necrose causada por ácido taurolitocólico (TLC-S) em células acinares	62
5.8.5. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos	63
5.8.6. Análise estatística	64
6. RESULTADOS	65
6.1. Efeito da lectina MoCBP4 sobre a atividade plasmática das enzimas amilase e lipase	65
6.2. Efeito da lectina MoCBP4 sobre a atividade plasmática das enzimas AST e ALT	66
6.3. Efeito da lectina MoCBP4 sobre o edema pancreático	67
6.4. Efeito da lectina MoCBP4 sobre atividade da mieloperoxidase no pâncreas, pulmão e fígado	68
6.5. Efeito da lectina MoCBP4 sobre a produção de EROs por neutrófilos estimulados por fMLP e PMA	69
6.6. Avaliação histológica do pâncreas, pulmão e fígado	70
6.7. Efeito da lectina MoCBP4 sobre as concentrações plasmáticas e pancreáticas das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6)	76
6.8. Efeito da lectina MoCBP4 sobre marcadores do estresse oxidativo no pâncreas	77
6.9. Efeito da lectina MoCBP4 sobre o nitrito plasmático e pancreático	78
6.10. Efeito da lectina MoCBP4 sobre a imunomarcação de COX-2 e TNF- α no pâncreas através da técnica imunohistoquímica	79
6.11. Efeito da lectina MoCBP4 sobre a imunomarcação de iNOS e NF- κ B no pâncreas através da técnica imunofluorescência	82
6.12. Efeito da lectina MoCBP4 sobre a concentração do íon cálcio citosólico em células acinares isoladas	85
6.13. Efeito da lectina MoCBP4 sobre a necrose induzida por TLC-S em células acinares isoladas	87
7. DISCUSSÃO	89
8. CONCLUSÃO	105
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

1. Introdução

A pancreatite aguda (PA) é definida como uma inflamação pancreática que pode vir a comprometer outros tecidos e sistemas de órgãos distantes devido a uma resposta inflamatória sistêmica que, por sua vez, acarreta significativa morbidade e mortalidade entre 20% a 30% dos pacientes (VEGE, 2011). Dentre as principais causas da pancreatite aguda estão a passagem de cálculo pelo ducto biliar comum e o excesso de ingestão alcoólica que, juntos, correspondem a aproximadamente 80% dos casos (BECKNGHAM; BORNMA, 2001).

A patogênese da pancreatite aguda é multifatorial sendo conduzida principalmente por mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio. O evento central é caracterizado pela a ativação prematura intrapancreática do tripsinogênio que resulta em autodigestão do pâncreas. Este processo desencadeia alterações da microcirculação e ativação local do sistema imune, incluindo macrófagos e células T (MEIRELES JR. *et al.*, 2003). Ainda na fase inicial, a ativação do sistema complemento provoca a migração e posterior ativação de neutrófilos no pâncreas com subsequente aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, metabólitos do ácido araquidônico e espécies reativas de oxigênio, os quais são responsáveis pela amplificação da resposta inflamatória. Todos estes mediadores inflamatórios estão relacionados com as manifestações locais e sistêmicas da pancreatite aguda, determinando diretamente a gravidade da doença (RENNER; SAVAGE; PANTOJA, 1985; COELHO *et al.*, 1993).

No Brasil, de acordo com o Datasus, no período de janeiro de 2015 a janeiro de 2016, houve 34.276 internações por pancreatite aguda, com um gasto anual de R\$ 26.049.195,08 e mortalidade de 5,6%. O estado do Ceará apresenta dados estatísticos semelhantes à média nacional (DATASUS, 2016).

Até o momento, ainda não existe tratamento específico disponível para a pancreatite aguda. As alternativas terapêuticas disponíveis são, prioritariamente, sintomáticas e baseadas na avaliação precoce da severidade da doença com o intuito de reduzir a dor, oferecer terapia de suporte, suprir as necessidades nutricionais e prevenir a infecção pancreática e a disseminação do processo inflamatório para outros órgãos e sistemas orgânicos (BANG *et al.*, 2008).

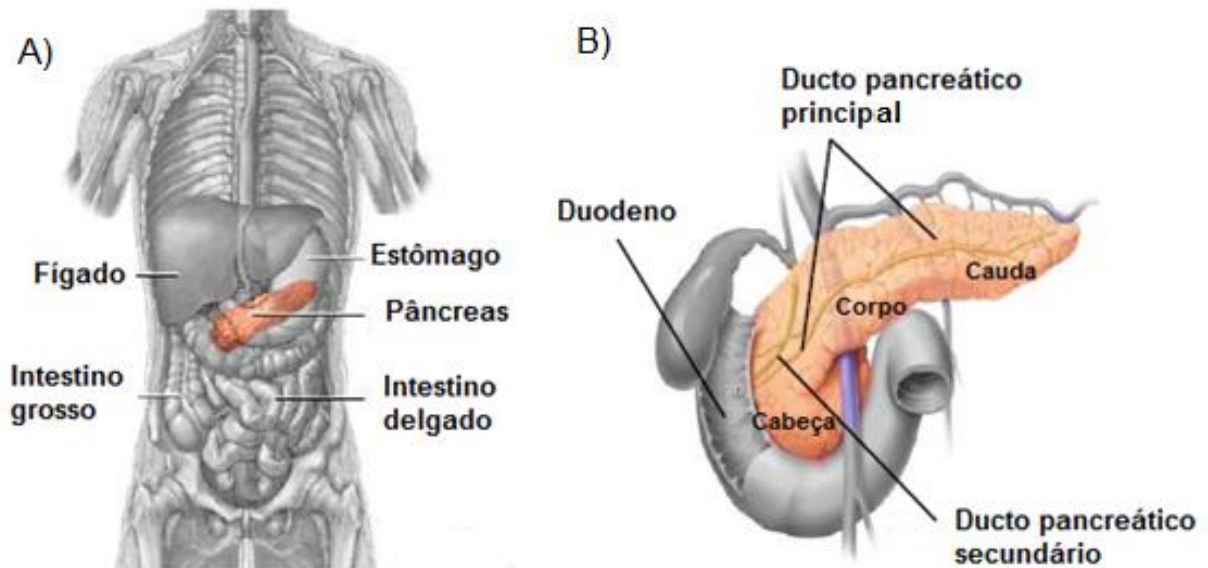
Neste contexto, uma vez que não há tratamento específico para a pancreatite aguda, além das suas significativas taxas de morbidade/mortalidade e do elevado custo econômico, esta condição patológica desperta o interesse clínico e científico para a descoberta de novas alternativas farmacológicas que possam vir a solucionar tal problema.

2. Revisão de literatura

2.1. Pâncreas

Em humano adulto, o pâncreas é um órgão considerado relativamente pequeno que pesa cerca de 80 g e mede aproximadamente 15 cm de comprimento. Situa-se, em condições normais, na porção superior do abdômen, em área posterior ao estômago, em posição retro-peritoneal, fixado à parede abdominal posterior (Figura 1 A). Como demonstrado na figura 1 B, o pâncreas se divide em três regiões distintas, a cabeça, que se aloja na curva do duodeno, o corpo e a cauda (PANDOL, 2010).

Figura 1: Localização anatômica do pâncreas humano.



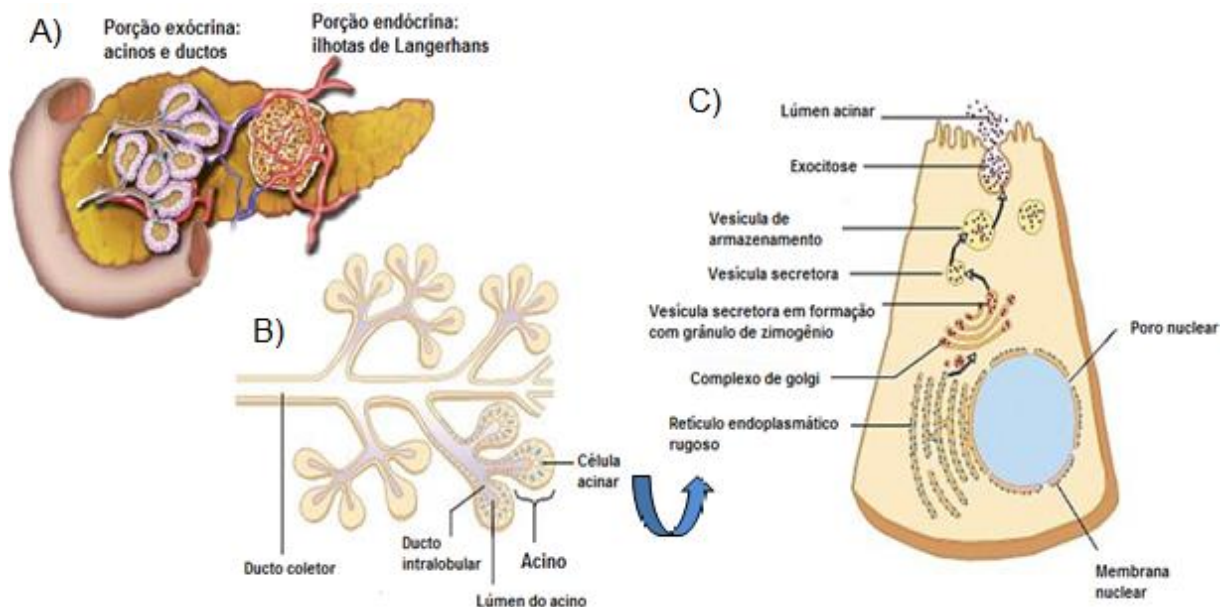
Fonte: Adaptado de Medline Plus Medical Encyclopedia Image.

Este órgão compõe o sistema digestório humano e é classificado como uma glândula mista por possuir duas porções funcionais distintas: a endócrina e a exócrina (Figura 2 A). Correspondendo a 1- 2% do órgão, as ilhotas de Langerhans representam a porção endócrina, as quais secretam insulina, glucagon, somatostatina, amilina e polipeptídeo pancreático que atuam mantendo a homeostase da glicose sanguínea. A porção exócrina corresponde cerca de 85% do pâncreas e

atua na produção e secreção das enzimas digestivas presentes no suco pancreático (LEUNG; IP, 2006; PANDOL, 2010).

A unidade funcional do pâncreas exógeno é composta por um ácino e seu ducto tubular (Figura 2 B). Os sistemas de ductos se estendem do lúmen do acino até o duodeno. As células acinares são especializadas em sintetizar, armazenar e secretar as enzimas digestivas. Apresentam uma região basal que contém o núcleo bem como abundante retículo endoplasmático rugoso para síntese de proteínas, e uma região apical, a qual contém os grânulos de zimogênio que armazenam as formas enzimáticas inativas, proenzimas ou zimogênio (PANDOL, 2010) (Figura 2 C). O conteúdo granular é secretado nos sistemas ductais que ao final desembocam no duodeno através do esfíncter de Oddi (LEUNG; IP, 2006).

Figura 2: (A) Porções distintas do pâncreas, (B) detalhes da disposição dos ácinos e (C) célula acinar.



Fonte: adaptado de LODSH *et al.*, 2000.

As principais enzimas digestivas que compõem o suco pancreático são: tripsina, quimiotripsina, carboxipolipeptidases, ribonucleases, desoxiribonucleases, amilase pancreática, lipase pancreática, esterases e fosfolipases (GARDNER, 1979). As enzimas proteolíticas, citadas acima, estão contidas nos grânulos na sua forma inativa (tripsinogênio, quimiotripsinogênio, pro-carboxipolipeptidases) até serem excretadas no lúmen intestinal, local onde serão ativadas. Caso contrário,

poderiam digerir o próprio pâncreas. O tripsinogênio é uma enzima central, pois uma vez ativada, apresenta capacidade de auto-catalização além de ativar as outras enzimas. Portanto, a fim de evitar danos teciduais, as células acinares também secretam substâncias que inibem a ativação precoce do tripsinogênio (RARATY *et al.*, 2005). Estes inibidores de tripsina se ligam ao sítio catalítico desta enzima e são responsáveis por inibir cerca de 20% da atividade potencial da tripsina (HIROTA *et al.*, 2006).

Para que ocorra a exocitose dos grânulos de zimogênio, hormônios e neurotransmissores se ligam e ativam seus receptores específicos presentes na membrana basolateral das células acinares. Fisiologicamente, a gastrina e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) ao se ligarem aos seus receptores promovem a ativação da adenilato ciclase e conseqüentemente o aumento intracelular de AMPc que, por sua vez, ativa a proteína quinase A, resultando na secreção enzimática (WILLIAMS 2001; PANDOL, 2010). De outro modo, a colecistocinina (CCK), acetilcolina, peptídeo liberador de gastrina e substância P promovem secreção enzimática através da ativação das vias de sinalização de inositol trifosfato/diacilglicerol que culminam na elevação de Ca^{2+} citosólico e conseqüente exocitose (WASLE; EDWARD, 2002).

Embora o pâncreas possua mecanismos capazes de prevenir a ativação precoce dos grânulos de zimogênio, em condições de dano pancreático, estes mecanismos protetores apresentam eficiência limitada e, como resultado desta limitação, ocorrerá a ativação das enzimas digestivas ainda no pâncreas, desencadeando a condição clínica denominada pancreatite aguda (GRADY *et al.*, 1998; SALUJA *et al.*, 1999).

2.2. Pancreatite aguda

A pancreatite aguda (PA) é uma doença inflamatória do pâncreas com comprometimento do parênquima pancreático e, dependendo da intensidade, acomete também os tecidos próximos (peripancreáticos) e/ou sistemas de órgãos distantes. A litíase biliar e o alcoolismo são os fatores etiológicos mais comuns da PA e respondem por cerca de 80% dos casos em adultos. As causas menos comuns incluem hipertrigliceridemia, hipercalcemia, terapia medicamentosa, doenças

autoimunes, trauma, fatores hereditários, dentre outras (MORGAN, 2008; O'CANNOR; BUKLEY; MAHER, 2011; BRUN; AGARWAL; PITCHUMONI, 2011).

De acordo com a severidade e duração, a pancreatite aguda se apresenta sob formas clínicas distintas podendo variar desde quadros inflamatórios leves, moderados e autolimitados até casos mais graves com extensa necrose no pâncreas evoluindo com insuficiência de múltiplos órgãos (IMO) principalmente pulmão, fígado e rins (GRANGER; REMICK, 2005). A **pancreatite aguda edematosa** se caracteriza como uma doença inflamatória moderada com pouca necrose das células acinares. Em casos avançados, a pancreatite se torna grave e algumas vezes fatal devido à intensa necrose acinar e hemorragia pancreática, sendo, nesse caso, classificada como **pancreatite aguda hemorrágica necrosante**. Ademais, episódios frequentes de pancreatite aguda podem desencadear a **pancreatite crônica**, caracterizada pela progressiva fibrose, conduzindo a insuficiência pancreática (SCARPELLI *et al.*, 1994).

Aproximadamente 80% dos pacientes com PA apresentam a forma leve da doença com boa evolução quando utilizado o tratamento conservador. Entretanto, cerca de 20 a 30% dos casos evoluem para formas mais graves, com significativa morbimortalidade (VEGE, 2011). Com relação à taxa de mortalidade, cerca de 50% dos óbitos ocorre nos primeiros 14 dias de admissão devido principalmente a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) secundária à necrose, enquanto os óbitos remanescentes ocorrem numa fase mais tardia, em função das complicações infecciosas e também da necrose pancreática (MUTINGA *et al.*, 2000). A pancreatite aguda grave acompanhada por insuficiência respiratória, renal e hepática está correlacionada com uma alta taxa de mortalidade de 43%, 63% e 83%, respectivamente (HALONEN *et al.*, 2002; HAJJAL *et al.*, 2012).

O sinal clínico que melhor caracteriza a pancreatite é a dor abdominal intensa, podendo ser constante e incapacitante (ESCOTT-STUMP, 2007), inicialmente epigástrica e irradiada para o dorso em faixa ou para todo o abdômen. Náuseas, vômitos e diarreias também são sintomas comuns, além da presença de febre, hipotensão, alteração respiratória e distensão abdominal (CARROL *et al.*, 2007; TENNER *et al.*, 2013).

O diagnóstico da pancreatite aguda requer confirmação de pelo menos duas das seguintes características: (1) início súbito de dor abdominal aguda irradiando para as costas, dor epigástrica, (2) atividades de amilase e/ou lipase séricas

aumentadas, pelo menos três vezes maiores que os parâmetros considerados normais, e (3) achados de imagens característicos de pancreatite aguda em tomografia computadorizada, ressonância magnética ou ultrassonografia abdominal (BUSIREDDY *et al.*, 2014).

Ainda não há alternativas terapêuticas disponíveis para curar a pancreatite aguda. Atualmente o tratamento se limita a aliviar os sintomas clínicos com a utilização de analgésicos, antieméticos e oxigenoterapia; dar suporte hídrico e nutricional ao paciente; prevenir a necrose, a falência de múltiplos órgãos e a infecção; além de monitorar os sinais vitais do paciente (ROSA *et al.*, 2004; CARROOL *et al.*, 2007; FROSSARD *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2012).

Fisiopatologia da pancreatite aguda

O processo fisiopatológico da PA apresenta como evento central a ativação intrapancreática prematura do tripsinogênio que, por sua vez, ativa outras enzimas pancreáticas com subsequente autodigestão tecidual. Um dos primeiros eventos que é comum às diferentes etiologias da pancreatite, é o bloqueio da secreção das enzimas pancreáticas, enquanto que a síntese se mantém constante (SALUJA *et al.*, 2007). Em seguida o tripsinogênio é ativado no interior das células acinares em quantidades suficientes para ultrapassar a capacidade normal de defesa do pâncreas. A tripsina é capaz de ativar, além das outras enzimas digestivas, diferentes cascatas incluindo o complemento, cinina-caliceína, coagulação e fibrinólise (ELFAR *et al.*, 2007). Ademais, espécies reativas de oxigênio, liberadas secundariamente à injúria pancreática, causam inativação dos inibidores de proteases circulantes, contribuindo para a manutenção do ciclo crescente de proteases ativas. São conferidos também o aumento da concentração intracelular do cálcio e redução do pH, ambos causam ativação prematura do tripsinogênio (ELFAR *et al.*, 2007).

Este evento lesivo desencadeia alterações da microcirculação do tipo vasoconstrição, estase, diminuição da saturação de oxigênio e isquemia progressiva, os quais determinam inicialmente o aumento da permeabilidade vascular e edema. Quando a lesão vascular é de intensidade maior, ocorrem lesão e rompimento das membranas celulares, causando, além do edema, a necrose e a

hemorragia do parênquima pancreático e dos tecidos pancreáticos (COELHO *et al.*, 2013).

Sabe-se que o dano na célula acinar é responsável pela ativação local do sistema imune, incluindo células dendríticas, macrófagos, fibroblastos e células T (MEIRELLES JR. *et al.*, 2003). Ainda na fase inicial da PA, a ativação do complemento leva a quimiotaxia de leucócitos e ativação de neutrófilos e macrófagos circulantes que, por sua vez, liberam citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL1- β , IL-6 e IL-8), metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, prostaciclina, tomboxano, leucotrienos e lipoxinas), enzimas proteolíticas e lipolíticas, além de espécies reativas de oxigênio. Todos estes mediadores estão relacionados com as manifestações locais e sistêmicas da PA e com a gravidade da doença (RENNER; SAVAGE; PANTOJA, 1985; COELHO *et al.*, 1993).

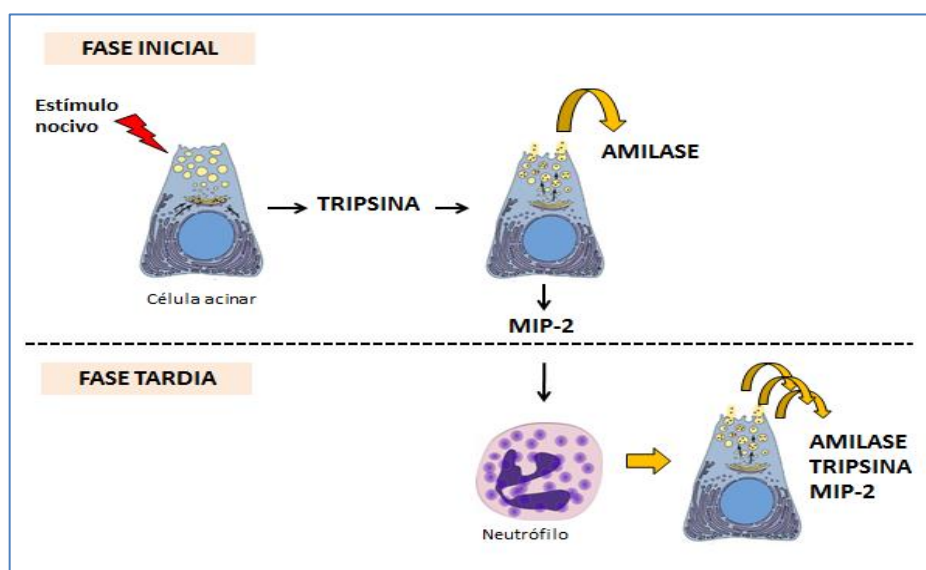
Diante da capacidade dos neutrófilos ativados em liberar diversos mediadores inflamatórios, o recrutamento exacerbado destas células para o pâncreas consiste em um dos eventos críticos no desenvolvimento da pancreatite aguda (BHATIA, 2005). Estudos prévios demonstram que a depleção de neutrófilos, induzida por tratamento com soro anti-neutrófilo ou anticorpo monoclonal específico, reduziu consideravelmente danos pancreático e pulmonar na pancreatite experimental (FROSSARD *et al.*, 1999; GUKOVSKAYA *et al.*, 2002; ABDULLA *et al.*, 2011). Outro trabalho mostra que a depleção de neutrófilos reduziu o dano tecidual durante a pancreatite aguda, entretanto, estas células não apresentaram efeito sobre a ativação inicial do tripsinogênio, sugerindo que a ativação proteolítica no pâncreas é um processo dinâmico que pode ser dividido em uma fase inicial, independente de neutrófilos, e uma fase tardia, dependente de neutrófilos (Figura 3) (ABDULLA *et al.*, 2011).

Acredita-se que o recrutamento de neutrófilos para o tecido pancreático seja regulado por moléculas de adesão e quimiocinas (MERZA *et al.*, 2013), já que a expressão de P-selectina se encontra aumentada em diversos modelos experimentais de pancreatite aguda (ABDULLA *et al.*, 2012; HARTMAN *et al.*, 2012). Carvalho e col. (2014) comprovaram efeito benéfico de um inibidor de P e L-selectinas, a fucoidina, sobre parâmetros inflamatórios locais e sistêmicos em pancreatite experimental induzida por TLCS (ácido taurolitocólico) ou ceruleína. Em adição, é sabido que os neutrófilos estão envolvidos no desenvolvimento da necrose acinar em pancreatite aguda, devido da ação de seus produtos oxidantes (H₂O₂, O₂⁻

e NO), os quais são potencialmente danosos às estruturas celulares (SANDOVAL *et al.*, 1996).

A progressão da resposta inflamatória é acompanhada pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por sua vez, atuam exacerbando o dano celular com lesões na membrana e no citoesqueleto, além de afetar a atividade enzimática, danificam o DNA, depletam os níveis de antioxidantes e ativam o fator de transcrição nuclear NF- κ B (RAKONCZAY, 2003). Gukovsky e col. (1998) relataram pela primeira vez a ativação deste fator em células acinares durante a pancreatite. Tal fator tem papel essencial no início da pancreatite aguda, pois quando ativado é capaz de regular a transcrição de moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias e enzimas. O estudo comprova que o aumento da expressão de NF- κ B induzido por manipulação genética em ratos foi capaz de produzir uma inflamação pancreática semelhante à pancreatite aguda (HONG-SHAN *et al.*, 2003). Logo após a ativação de NF- κ B em modelos de indução de pancreatite experimental com ceruleína, TLCS ou ligação ductal, ocorre a indução da expressão de genes da Proteína 1 da atração de monócitos (MCP-1), IL-8, TNF- α , IL-6 e moléculas de adesão, com migração e ativação de monócitos, macrófagos, linfócitos T e outros polimorfonucleares (DEMOLS; DEVIERE, 2003).

Figura 3: Função regulatória dos neutrófilos sobre a ativação do tripsinogênio na fase tardia da pancreatite.



Fonte: Modificado de Abdulla *et al.*, 2011.

As células acinares e do interstício pancreático secretam mediadores inflamatórios quando estimuladas por agentes que causam a pancreatite. Portanto, funcionam em parte como células inflamatórias com capacidade de iniciar e manter uma resposta inflamatória (RAKONCZAYR, 2008). As citocinas, uma vez produzidas por estas células, apresentam importante função no desenvolvimento da pancreatite aguda. Dentre as citocinas, destacam-se aquelas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e fator- α de necrose tumoral, e a citocina anti-inflamatória IL-10, capaz de modular negativamente a liberação das outras citocinas citadas (BAGGIOLINI *et al.*, 1989; NORMAN., 1998).

A síntese de citocinas uma vez iniciada atingirá outros órgãos, a partir de leucócitos circulantes ativados, células do sistema fagocítico-mononuclear e outras células, configurando a Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) caracterizada por aumento de níveis séricos de IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-18 (MAYER *et al.*, 2000; WERESZCZYNSKA-SIEMIATKOWSKA *et al.*, 2002).

Os níveis de TNF- α e IL-1 β estão elevados no início e durante a progressão da pancreatite aguda, e a inibição destas citocinas atenua a gravidade da pancreatite em diferentes modelos experimentais (NORMAN *et al.*, 1995; HIROTA *et al.*, 2000; BHATIA *et al.*, 2005). O TNF- α em conjunto com a IL-6 participa da patogênese da PA e na geração de mediadores que levam à complicações de órgãos distantes, a exemplo da indução da síntese hepática de proteínas de fase aguda (ZHANG *et al.*, 2013; SHCÜTTE; MALFERTHEINER, 2008). Os níveis de TNF- α aumentam significativamente quando a pancreatite aguda é acompanhada por comprometimento pulmonar (MALLEO *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008). A IL-6 é um potente ativador linfocitário, sendo utilizada como fator de diagnóstico precoce e predição de gravidade. É uma citocina pró-inflamatória e seus níveis estão aumentados precocemente, mesmo nas formas leves de PA com processo inflamatório localizado (POORAN *et al.*, 2003). Os níveis de IL-6 correlacionam-se com o risco de infecção (RICHÉ *et al.*, 2003).

Os sinais intracelulares de Ca²⁺ controlam a secreção normal das células acinares, mas podem se tornar um fator crítico na patogênese. As concentrações fisiológicas de acetilcolina e colecistocinina (CCK) geram elevações repetitivas nas concentrações de Ca²⁺ citosólico, as quais estimulam a geração de ATP mitocondrial e secreção dos grânulos de zimogênio (PETERSON; TEPIKIN 2008). Em contrapartida, ácidos biliares, metabólitos oxidativos e não oxidativos do etanol e

hiperestimulação com CCK provocam elevação global e sustentada de Ca^{2+} citosólico que, por sua vez, induz a ativação precoce das enzimas, disfunção mitocondrial, vacuolização, necrose e prejudicam a autofagia (VERONINA *et al.*, 2015; SHAUBUEVA *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2014; MULPHY *et al.*, 2008; CRIDDLE *et al.*, 2006; 2009). Estudos anteriores demonstram que a quelação de Ca^{2+} impede a ativação prematura do tripsinogênio, vacuolização nas células acinares e atenua a gravidade da PA em modelos experimentais *in vivo* (RARATY *et al.*, 2000; MOOREN *et al.*, 2003).

2.3. Modelo de pancreatite aguda induzida por ceruelína

Apesar da pancreatite aguda ser uma das doenças gastrintestinais mais comuns, mesmo no século XXI, nem a etiologia nem a fisiopatologia da doença foram plenamente compreendidas e o tratamento ainda não está disponível. Por esta razão, tem crescido o interesse da comunidade científica em investigar os eventos desencadeantes da pancreatite aguda e propor novas estratégias de tratamento. Grande parte dos conhecimentos científicos atuais sobre o início da pancreatite não foi obtida de estudos envolvendo o pâncreas humano ou pacientes com a doença, mas a partir de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Os modelos de pancreatite experimental que se assemelham à situação humana são ferramentas fundamentais e insubstituíveis para o avanço na compreensão dos mecanismos complexos desta condição e também para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. O modelo ideal deve abranger várias características comuns como morfologia e fisiopatologia semelhantes às da situação humana, além de ser facilmente reproduzível e ter a possibilidade de variar a gravidade da pancreatite aguda de forma padronizada de acordo com os objetivos experimentais (CHAN; LEUNG, 2007).

A pancreatite induzida por ceruleína, um secretagogo análogo à colecistocinina (CCK), é amplamente utilizada para analisar as desordens da fase inicial da pancreatite. O modelo oferece como vantagens a indução rápida e não-invasiva, altamente reprodutível e aplicável em várias espécies animais tais como camundongos, ratos, hamsters e cães. Este modelo causa a pancreatite do tipo edematosa caracterizada por aumentar as atividades das enzimas pancreáticas

amilase e lipase, vacuolização das células acinares, porém com baixa taxa de mortalidade (CHANG; LEUNG, 2007; LERCH; ADLER, 1994). A ceruleína ativa os receptores de CCK e hiperestimula as células acinares e conseqüente ativação prematura do tripsinogênio seguida de autodigestão pancreática (CHANG; LEUNG, 2007).

Após 11 e 24 horas da indução da pancreatite aguda pelas administrações repetidas de ceruleína, observam-se danos ao tecido pancreático caracterizado por infiltrado de células inflamatórias, vacuolização, depleção dos grânulos de zimogênio, necrose e edema, bem como alterações dos parâmetros laboratoriais como aumento de amilase e lipase séricas, das citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (MALLEO *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2013). O comprometimento da função pulmonar e hepática também foi relatado em estudos prévios. Estes achados tornam este modelo experimental particularmente importante, pois as disfunções pulmonar e hepática são agravantes comumente presentes em pacientes com pancreatite (ESREGOGLU *et al.*, 2006; PASTOR *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2016; BAKIR *et al.*, 2015).

2.4. Lectinas: definição e breve histórico

As lectinas representam uma classe de proteínas que possuem pelo menos um domínio não-catalítico e se ligam de forma específica e reversível a um mono ou oligossacarídeo (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Esta ligação com resíduos de carboidratos pode ser de alta especificidade como aquelas que acontecem entre antígeno-anticorpo ou enzima-substrato (MINKO, 2004), entretanto, não ocorre alteração das estruturas químicas dos ligantes (GRANJEIRO 1996). São proteínas ubíquas na natureza, sendo encontradas em quase todos os organismos, desde vertebrados, invertebrados até vírus e bactérias (PEUMANS & VAN DAMME, 1996). Em acréscimo, as lectinas também são proteínas heterogêneas que participam de vários eventos fisiológicos ou patológicos, dependendo da capacidade de ligação a determinados carboidratos (JAQUES *et al.*, 2013).

Embora muitas lectinas se liguem a açúcares simples, tais como manose, glucose, frutose, galactose, N-acetil-D-galactosamina ou N-acetil-D-glucosamina, elas apresentam maior afinidade por carboidratos conjugados, como as

glicoproteínas e os glicolípídeos. Ao interagir com glicoconjugados da superfície celular, as lectinas podem promover a formação de ligações cruzadas entre células adjacentes, resultando em aglutinação das mesmas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

O primeiro estudo descrevendo lectinas foi desenvolvido por Silas Weir Mitchell, em que foi observada a aglutinação rápida de uma gota de sangue de pombo quando misturada ao veneno da cobra *Crotalus durissus* (MITCHELL, 1860). No ano de 1888, Hermman Stillmark isolou a primeira lectina vegetal, denominada ricina, proveniente de sementes de mamona (*Ricinus communis*). Esta lectina, altamente tóxica, apresentou atividade aglutinante frente a hemácias de diferentes espécies animais. Sumner e Howell, em 1936, demonstraram que a hemaglutinação causada pela lectina vegetal concanavalia A (Con A) era inibida pela sacarose, demonstrando pela primeira vez a especificidade de uma lectina por açúcar (SHARON; LIS, 2004). Mais tarde a especificidade das hemaglutininas vegetais para diferentes grupos sanguíneos foi descrita por Renkonen (1948) e Boyd, Requera (1949) e, somente em 1952, foi demonstrado que esta especificidade estava relacionada à atividade de ligação a carboidrato (WATIKINS; MORGAN, 1952). Em conjunto, estes estudos contribuíram para o estabelecimento das bases químicas das substâncias que caracterizam os grupos sanguíneos do sistema ABO. A habilidade das aglutininas de plantas em distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos levou Boyd e Shapleigh a propor em 1954 o termo lectina (do latim “legere”, que significa selecionar ou escolher) para nomear essas proteínas (SHARON; LIS, 2004).

A partir dos estudos citados acima, a ciência da lectinologia vem, até então, crescendo exponencialmente. Este interesse parte do princípio do uso de lectinas na detecção, no isolamento e na caracterização dos oligossacarídeos, na tipagem sanguínea e na identificação de glicoconjugados. Além disso, as lectinas são abundantes na natureza, o que de certa forma facilita sua obtenção.

2.5. Lectinas Vegetais

Em condições normais, considera-se que as prováveis funções das lectinas em plantas sejam a estocagem de proteínas, o transporte de carboidratos

(NAKAMURA *et al.*, 2004) e principalmente a defesa do vegetal contra fitopatógenos, tais como vírus, bactérias, fungos, nematoides ou insetos (MURDOCK *et al.*, 1990; RIPOLL *et al.*, 2003; WONG *et al.*, 2010). Outra característica intrínseca que reforça a íntima relação entre lectinas e defesa do vegetal seria a sua ampla distribuição neste reino, sendo as lectinas de sementes as mais comumente isoladas, embora mereça destaque também aquelas encontradas nas raízes (*Urtica*, *Phitolacca*, *Sambucus*), folhas (*Aloe*, *Lactuca*, *Vicia*), cascas (*Sambucus*, *Sophora*, *Robinia*), tubérculos ou bulbos (*Solanum*, *Galanthus*, *Scilla*) (RUDIGER & GABIUS, 2001).

As lectinas de plantas são as mais estudadas devido seus impactos econômicos e nutricionais, mas principalmente pela praticidade de obtenção. No entanto, apesar da enorme quantidade de informações disponíveis sobre as sequências e especificidades desta classe de moléculas, o papel fisiológico das lectinas de plantas ainda não é totalmente claro.

Comprovadamente, as lectinas possuem a capacidade de interferir no processo de formação de biofilmes microbianos (TEIXEIRA *et al.*, 2006; CAVALCANTE *et al.*, 2011). Por outro lado, algumas infecções são iniciadas pela interação lectina-carboidrato, nas quais os patógenos desenvolvem mecanismos de adesão às células dos hospedeiros, porém são estas mesmas interações que fazem com que as células de defesa do hospedeiro interajam com patógenos para posterior eliminação (SHARON; LIS, 1993).

Considerando as propriedades estruturais das lectinas vegetais, Peumans & Van Damme (1995) propuseram uma classificação baseada na presença ou não de sítios catalíticos de afinidade a carboidratos na própria molécula proteica. A partir destas características distintas, as lectinas foram classificadas em três classes: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. Posteriormente, foi incluída a quarta classe, as superlectinas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

As merolectinas consistem apenas de um sítio de ligação a carboidrato, ou seja, um único domínio lectínico. Por apresentar natureza monovalente, estas lectinas não aglutinam células ou precipitam glicoconjugados. Um exemplo dessa classe de proteínas é a lectina haveína purificada de *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

As hololectinas apresentam dois ou mais domínios carboidrato-ligantes, contendo pelo menos dois de tais domínios idênticos ou bastante homólogos que se

ligam a açúcares estruturalmente semelhantes. Esta classe, a qual se inclui a maioria das lectinas vegetais, caracteriza-se por aglutinar células e precipitar conjugados. Como representante desta classe temos a lectina Concanavalina A (Con A), purificada a partir das sementes de *Canavalia ensiformis*.

As quimerolectinas apresentam um ou mais sítios de ligação a carboidrato, além de outro domínio, distinto dos sítios lectínicos, com atividade catalítica ou outra função biológica bem definida. Dependendo do número de domínios carboidratos-ligante, as quimerolectinas podem comportar-se como merolectinas ou hololectinas. As proteínas inativadoras de ribossomos tipo II (RIPs do tipo II) são exemplos de quimerolectinas.

Por fim, as Superlectinas são aquelas que apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidrato, sendo que estes domínios se ligam a açúcares estruturalmente distintos. Como representante desta classe, podemos citar a lectina de tulipa denominada TxLC-1.

Avanços nas abordagens bioquímicas, clonagem molecular e análises estruturais de lectinas vegetais têm revelado importantes diferenças entre estas biomoléculas. Considerando aspectos evolutivos e estruturais, este grupo de proteínas vegetais heterogêneo foi subdividido em sete famílias distintas: lectinas de leguminosas, lectinas ligantes à quitina, lectinas relacionadas à jacalina, lectinas inativadoras de ribossomos do tipo II (RIP tipo II), lectinas de Amaranthaceae e lectinas do floema de Cucurbitaceae (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Do ponto de vista estrutural, as lectinas ligantes à quitina são proteínas que contêm um ou mais domínios heveínicos. O termo heveína refere-se a um polipeptídeo de 43 resíduos de aminoácidos, encontrado no látex da seringueira *Hevea brasiliensis*. Estas lectinas são ubíquas em plantas e se ligam especificamente ao carboidrato *N*-acetil-*D*-glucosamina ou ao biopolímero (quitina) formado por resíduos deste mesmo carboidrato (RAIKHEL; LEE, 1993; ASENSIO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2006). Dentre as lectinas ligantes à quitina, destacam-se aquelas encontradas em sementes de *Chelidonium majus*, *Phytolacca americana*, *Urtica dioica* (UDA), gérmen de trigo (WGA), *Triticum aestivum*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum*, dentre outras (RAIKHEL; LEE, 1993; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; TRINDADE *et al.*, 2006).

2.6. Efeitos biológicos de lectinas vegetais

Os carboidratos foram, mais recentemente, referidos como moléculas portadoras de informações biológicas determinantes para o reconhecimento de variados processos fisiológicos e patológicos (MISLOVICOVÁ *et al.*, 2009). Por formarem uma camada que recobre a célula, os açúcares que constituem o glicocálice são as primeiras moléculas a serem encontradas e reconhecidas por outras moléculas, anticorpos e microorganismos invasores, como vírus e bactérias. Moléculas secretadas tais como toxinas e hormônios também podem se ligar a estes açúcares, os quais se comportam como receptores (DENNIS; NABI; DEMETRIOU, 2009).

As lectinas são hábeis em decodificar as informações fornecidas por glicanos e, por isso, são vistas como ferramentas úteis para caracterizar estes compostos uma vez que elas podem diferenciar estruturas distintas de carboidratos (KUNO *et al.*, 2005). Aliado a isso, a especificidade da ligação lectina-carboidrato torna estes compostos interessantes para uma diversidade de estudos na imunologia e biologia celular através das aplicações como marcadores histoquímicos, assim como para caracterizar estruturas de glicoconjugados ou açúcares de superfície celular (SHARON; LIS, 2004; CARDOZO *et al.*, 2007).

As notáveis propriedades antitumorais de algumas lectinas de plantas resultam da sua capacidade de induzir morte celular programada (apoptose) ou autofagocitose em células cancerígenas (FU *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2010; YU *et al.* 2011). Estas atividades têm atraído bastante atenção das ciências biomédicas. Devido a sua especificidade de ligação a carboidratos, as lectinas de plantas vêm se tornando cruciais como ferramenta de diagnóstico e prognóstico do câncer (HEINRICH *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2013; MAJEE; BISWAS, 2013; ROTH, 2011; SOUSA *et al.*, 2016). Ainda no campo da oncologia, a lectina de *Cratylia mollis* foi capaz de inibir a taxa de crescimento tumoral em camundongos inoculados com células do tipo sarcoma 80 (ANDRADE *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2016); a ConA apresentou atividade citotóxica sobre células cancerígenas hepáticas (CHANG *et al.*, 2007); a lectina de *Canavalia virosa* induziu autofagia em células C6 de glioma (OSTERNE *et al.*, 2017). Ademais, as lectinas vegetais têm sido utilizadas como alternativas terapêuticas contra o câncer, sendo que algumas destas moléculas já se

encontram em estágio de estudos pré-clínicos avançados e estudos clínicos (GEMEINER *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2010).

Células endoteliais apresentam glicoproteínas em sua superfície que podem vir a interagir com lectinas e como resultado haver o relaxamento vascular. Lectinas purificadas a partir da subtribo *Diocleinae* são hábeis em causar relaxamento da aorta via produção de óxido nítrico e prostaciclina. Porém, tal atividade é inibida quando estas lectinas estão associadas aos seus carboidratos ligantes, demonstrando a importante relação entre sítio lectínico de ligação a carboidrato e a atividade biológica das lectinas (GADELHA *et al.*, 2005; ASSREUY *et al.*, 2009; BEZERRA *et al.*, 2011; 2013; BARROSO *et al.*, 2014).

O uso de lectinas vem se destacando também por promover avanços na endocrinologia. Cita-se, como exemplo, a lectina de gérmen de trigo (WGA) que, comportando-se como um transportador específico, favoreceu a absorção oral da insulina via lipossomos quando administrada em camundongos diabéticos. O estudo propõe que WGA se liga às células intestinais e facilita a absorção da insulina (ZHANG *et al.*, 2005). Cavada e colaboradores (2003) demonstraram a capacidade das lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea virgata*, *Dioclea rostrata* e *Cratylia floribunda* (glucose/manose específicas) em fosforilar receptor de insulina, sugerindo-as como potenciais alternativas para diabetes.

Com relação às atividades inflamatórias e imunomodulatórias, os efeitos das lectinas em experimentos *in vivo* podem se contrapor a partir do momento que demonstram efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios dependendo da via de administração utilizada (ALENCAR *et al.*, 2004; 2010).

A lectina de *Canavalia brasiliensis* estimulou a produção de interferon- γ por linfócitos humanos (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992) e liberação de histamina por mastócitos (GOMES *et al.*, 1994). Quando administrada por via intraplantar, induziu a formação de edema na pata (BENTO *et al.*, 1993) e não foi capaz de diminuir o número de neutrófilos em lavado peritoneal de animais com peritonite (ASSREUY *et al.*, 1997). As lectinas de *Talisia esculenta*, *Vaitarea macrocarpa*, *Annona coriaceae*, *Dolichos lablab* também compartilharam semelhantes atividades pró-inflamatórias doses dependentes e com participação do domínio de ligação ao carboidrato em modelos de edema de pata e peritonite (ALENCAR *et al.*, 2004; FREIRE *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2014). A produção de óxido nítrico *in vivo* e *in vitro* por células peritoneais murinas também tem sido sugerida como atividade imunoestimulante

(ANDRADE *et al.*, 1999). Este efeito pró-inflamatório não descarta o potencial terapêutico destas moléculas, pelo contrário, a resposta inflamatória acompanhada do aumento do número de neutrófilos é vista como positiva no tratamento de infecções graves, principalmente em pacientes imunossuprimidos.

Apesar do potencial pró-inflamatório bem comprovado em diversos estudos, nosso grupo e outros demonstraram que lectinas vegetais quando administradas por via endovenosa, apresentam potente ação anti-inflamatória em modelos experimentais clássicos de inflamação (ALENCAR *et al.*, 2005; MOTA *et al.*, 2006; NUNES *et al.*, 2009; GIRÃO *et al.*, 2015). Lectina de *Luetzeburgia auriculata*, *Lonchocarpus sericeus*, *Lonchocarpus araripensis* e *Canavalia gradiflora* foram hábeis em reduzir o rolamento e adesão de neutrófilos no endotélio vascular *in vivo*, com envolvimento de óxido nítrico (ALENCAR *et al.*, 2010; NAPIMOGA *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2009). Além da inibição de eventos inflamatórios agudos, foi demonstrado ainda que lectinas vegetais previnem a lesão urotelial no modelo de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos (ASSREUY *et al.*, 1999).

No tocante à pancreatite e às células pancreáticas, algumas lectinas vegetais merecem destaque. Dados anteriores reportam o efeito inibitório das lectinas de germe de trigo (WGA) e *Ulex europaeus* (UEA-1) sobre a liberação de Ca^{2+} e α -amilase, causada por colecistocinina-8, em células acinares pancreáticas isoladas de ratos. Destaca-se aqui, o efeito da WGA ao inibir em 40% a secreção de α -amilase. Em seguida, foi demonstrado que este efeito é dose dependente e abolido pela pré-incubação de WGA com o açúcar N-acetil-D-glucosamina (JONAS *et al.*, 1995; 1998; MIKKAT *et al.*, 1998; 2001). WGA também promoveu atividade semelhante sobre as células cancerígenas pancreáticas da linhagem AR42J (DAMM *et al.*, 2004; MIKKAT *et al.*, 2001). Os receptores de colecistonina, expressos tanto nas células acinares quanto nas AR42J, são altamente glicosilados e, por esta razão, são hábeis a se ligar às lectinas (PEARSON *et al.*, 1987; MATOZAKI *et al.*, 1990; MILLER *et al.*, 1992; POIROT *et al.*, 1994). Devido a estas propriedades particulares, a WGA e a UEA-I são utilizadas em cromatografia com o intuito de purificar e isolar estes receptores a partir do homogenato do pâncreas (DUONG *et al.*, 1989; SZECOWK *et al.*, 1989). Outra lectina vegetal, a aglutinina de amendoim (PNA), foi considerada como importante ferramenta no processo de purificação de células acinares de pâncreas inflamado. Esta lectina foi capaz de isolar com alto

grau de pureza as células acinares (XIAO *et al.*, 2016). Estudos afirmam que a afinidade das lectinas por células pancreáticas é dependente de interações alostéricas entre elas (DAMM *et al.*, 2004; EBERT *et al.*, 2009).

2.7. *Moringa oleífera* Lamark: considerações gerais

Moringa oleífera (família das Moringaceae) é uma planta originária de regiões da Ásia, África e América do Sul, a qual se caracteriza por ser uma árvore perene de crescimento rápido e que se desenvolve bem, mesmo em solos pobres e secos (MORTON, 1991; RASHID *et al.*, 2008).

No Brasil, a espécie é conhecida no Maranhão desde 1950 e foi introduzida como planta ornamental (AMAYA *et al.*, 1992; GALLÃO *et al.*, 2006). Hoje, a *Moringa* tem ocorrência em toda região Nordeste e também nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso do Sul. Apresenta-se como uma árvore de porte bem menor do que a que é encontrada na Índia, possuindo caule delgado, muitas vezes único e copa aberta em forma de guarda-chuva (SILVA; KERR, 1999; LORENZI; MATOS, 2002; CYSNE, 2006). Seu caule é acinzentado e, quando injuriado, exsuda um látex branco. As folhas são verdes-pálida, decíduas alternadas, pecioladas e bipinadas ou, mais comumente, tripinadas, medindo em média 45 cm de comprimento. A raiz assemelha-se na aparência e no sabor ao rábano. A casca da raiz é espessa, mole e reticulada, de cor pardo-clara, externamente, e branca, internamente, lenho mole, poroso e amarelado (CÁCERES *et al.*, 1992). As flores são divididas em cálice e corola. São monóclinas, perfumadas, de cores creme ou branca, estando agrupadas em inflorescências terminais do tipo cimosa. Os frutos são pêndulos lineares, possuindo cor verde a marrom esverdeada, formato triangular e se quebram longitudinalmente quando secos. Geralmente, possuem de 20 a 50 cm de comprimento e armazenam de 10 a 20 sementes. Estas são globóides, medem até 1 cm de diâmetro, são escuras por fora e contêm no seu interior uma massa branca e oleosa (PALANISAMY; KUMERASAN, 1985; LORENZI; MATOS, 2002; CYSNE, 2006) (Figura 4).

Figura 4: (A) Árvore de *M. oleifera*; (B) Frutos imaturos; (C) Frutos maduros; (D) Sementes aladas.



Fonte: Pereira, 2010.

M. oleifera tem sido chamada de “árvore multiuso” devido à sua vasta utilização medicinal e industrial. Todas as partes desta planta têm sido utilizadas para diversos fins, como por exemplo: forragem animal (folhas e sementes), produção de biogás (folhas), agente de limpeza doméstica (folhas), fonte de corante azul (madeira), componente de fertilizantes (semente) e de adubo verde (folhas), complemento nutricional (suco das folhas), obtenção de goma (do tronco), fabricação de cordas (casca), fonte de taninos para curtimento (casca), aplicação no tratamento da água (sementes) e para fins ornamentais (Foidl *et al.*, 2001).

Ressalta-se também o alto valor nutricional deste vegetal Sanchez-Machado e col. (2010) afirmaram que a *M. oleifera* tem sido utilizada em várias partes do mundo em programas de nutrição adequados para população carente das áreas rurais e áridas. As flores desta planta são ricas em cálcio, potássio, flavonoides e aminoácidos essenciais. Já suas folhas possuem quantidades significativas de vitaminas A, B e C, além de cálcio, ferro e proteínas (RAMACHANDRAN *et al.*, 1980;

FERREIRA *et al.*, 2008). As vagens imaturas são fontes de fibras e com baixo teor de gordura (SANCHEZ-MACHADO *et al.*, 2010).

Apesar do uso difundido da *M. oleifera* como alimento na Índia, Paquistão, Filipinas, Havaí e várias partes da África, aqui no Brasil, o principal uso deste vegetal consiste na sua propriedade purificadora de água, sendo bastante propagada em todo o semiárido nordestino (GALLÃO; DAMASCENO; BRITO, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008). O extrato aquoso das sementes de *M. oleifera* é utilizado como coagulante natural dado ao seu elevado teor de proteínas catiônicas com massa molecular em torno de 13 kDa e ponto isoelétrico bastante alcalino (FERREIRA *et al.*, 2008).

2.8. Efeitos biológicos da *Moringa oleifera*

Por séculos e por muitas culturas ao redor do mundo, a *M. oleifera* tem sido útil para o tratamento de diversas patologias, que variam desde infecção de pele à anemia, asma, ansiedade e até cólera (KHAWAJA *et al.*, 2010; HAMZA, 2010; SINGH *et al.*, 2012). A *M. oleifera* também se mostrou eficaz contra processos inflamatórios, hipertensão, febre, úlceras, epilepsia e câncer (LAI *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2012; BERKOVICH *et al.*, 2013).

Hamza (2010) relatou atividade hepatoprotetora do extrato etanólico das sementes de *Moringa oleifera* em modelo animal de fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono. Este efeito foi correlacionado com as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes deste extrato. A quercetina foi purificada a partir dos extratos aquoso e etanólico das flores. Sugere-se que este metabólito é responsável pelo efeito hepatoprotetor (GILANI *et al.*, 1994; RUCKMANI *et al.*, 1998). Em estudo desenvolvido por Sinha e col. (2011), foi comprovado o efeito hepatoprotetor do extrato etanólico das folhas de *M. oleifera*. O dano hepático foi causado por exposição dos animais à radiação do tipo gama, no entanto aqueles que foram pré-tratados com o extrato mostraram inibição da translocação nuclear de NF- κ B, redução da peroxidação lipídica e aumento dos níveis de superóxido dismutase (SOD), glutatona reduzida (GSH) e catalase (CAT). A atividade hepatoprotetora deste extrato está relacionada à redução do estresse oxidativo no tecido hepático.

Ajit e col. (2002) reportaram atividade hipoglicemiante da *M. oleifera* em modelo de diabetes induzida por aloxano em ratos. A partir do extrato metanólico das folhas secas, isolaram compostos químicos que foram responsáveis pelo aumento da secreção de insulina em roedores (FRANCIS *et al.*, 2004). Estes efeitos da *M. oleifera* no metabolismo da glicose provavelmente estão correlacionados com a presença de terpenoides, os quais estimulam as células β pancreáticas e subsequente secreção de insulina (HAMZA, 2010). Porém, não se pode descartar a íntima relação entre a atividade antioxidante deste extrato e o seu efeito benéfico no diabetes. Jaiswal e col. (2013) demonstraram atividade aumentada das enzimas catalase e superóxido dismutase em ratos diabéticos tratados com o extrato das folhas. Paula e col. (2016), a partir das sementes de *M. oleifera*, isolaram uma fração proteica (Mo-Sc) com efeito hipoglicemiante lento e duradouro. Desta fração, foram isoladas proteínas com peso molecular similar ao da insulina humana e, por análise dot blot, estas proteínas se ligaram fortemente aos anticorpos anti-insulina, levando os autores a sugerir que estas proteínas são semelhantes à insulina.

Tratando-se das desordens cardiovasculares, foram isolados compostos químicos do extrato etanólico das folhas que se mostraram hábeis em reduzir a pressão arterial sistêmica de ratos. Possivelmente, este efeito é intermediado por bloqueio dos canais de cálcio (GILANI *et al.*, 1994). Panda e col. (2013) isolaram um alcaloide a partir das folhas de *M. oleifera* e comprovaram seu efeito cardioprotetor quando administrado por via oral em ratos tratados com isoproterenol, agente cardiotóxico. Este alcaloide reduziu marcadores séricos de danos cardíacos, bem como a peroxidação lipídica e necrose cardíaca.

Extratos de diferentes partes da *M. oleifera*, como sementes, folhas, cascas do caule e das raízes, foram reportados como potentes antimicrobianos (ARORA *et al.*, 2013). Onsare e col. (2013) relataram atividade do extrato aquoso das cascas das vagens de *M. oleifera* contra bactérias Gram positivas e negativas. Outros estudos mostraram que extratos aquoso e etanólico das folhas desta planta apresentam efeito contra *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* e *P. aeruginosa* (PEIXOTO *et al.*, 2011; GROSVENOR *et al.*, 1995; KUDI *et al.*, 1999; AWADH *et al.*, 2001). Há relatos que, na China, Taiwan, Índia, Paquistão e Sudão, o extrato etanólico das sementes de *M. oleifera* foi utilizado para tratamento caseiro de dermatoses fúngicas causadas por *Tinea pedis*, popularmente conhecida como “pé-de-atleta” (CHUANG *et al.*, 2007; DASTUR, 1977; RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; JAHN;

MUSNAD; BURGSTALLER, 1986). Lectinas isoladas a partir das sementes de *M. oleifera*, nomeadas MoCBP, demonstraram atividades contra diversas espécies de fungos fitopatogênicos (MoCBP3), reduziram o crescimento de diferentes espécies de *Candida* (MoCBP2) e apresentaram atividade contra o dermatófito *Trichophyton mentagrophytes* (MoCBP4) em ensaios *in vivo* e *in vitro*, provavelmente por aumentar a permeabilidade da membrana plasmática e a produção endógena de espécies reativas de oxigênio (GIFONI *et al.*, 2012; XAVIER FILHO *et al.*, 2016; LOPES, 2016).

Em complementação à medicina popular, diversos estudos comprovam os múltiplos efeitos da *M. oleifera* em processos intermediados por mediadores inflamatórios. Em modelo experimental de colite induzida por ácido acético, o extrato hidroalcolico das sementes de *M. oleifera* foi hábil em reduzir áreas ulcerativas, edema e infiltrado inflamatório no cólon de ratos; atividades estas, provavelmente, correlacionadas com a presença de polifenóis e flavonoides neste extrato (MINAIYAN *et al.*, 2014). Em ensaios com macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), o extrato dos frutos da *M. oleifera* reduziu, de maneira dose dependente, a liberação de TNF- α , IL1- β , IL-6, óxido nítrico e expressão de iNOS através da inibição da translocação nuclear de NF- κ B (LEE *et al.*, 2013). Resultados semelhantes foram obtidos com a fração acetato de etila isolada a partir das folhas desta planta (ARULSELVAN *et al.*, 2016). O extrato etanólico das sementes apresentou importante atividade imunomodulatória ao suprimir a resposta humoral e a atividade fagocítica dos macrófagos (MAHAJAN; MEHTA, 2010).

2.9. MoCBP4: *Moringa oleifera* – Chitin Binding Protein

MoCBP4 é uma proteína ligante à quitina que foi isolada a partir das sementes de *M. oleifera* por Pereira e col. (2011). Trata-se de uma glicoproteína com atividade floculante, de massa molecular aparente de 9,8 kDa, ponto isoelétrico de 10,55 e estruturalmente formada por duas cadeias distintas interligadas por pontes dissulfeto. A MoCBP4 não foi hábil em aglutinar eritrócitos de coelho e humanos (A, B e O), mesmo quando tratados com tripsina. Por esta razão, de acordo com a classificação de Peumans e Van Damme (1995), MoCBP4 seria classificada como uma merolectina, já que foi incapaz de aglutinar células por ter apenas um sitio de ligação à carboidrato.

MoCBP4 apresenta estrutura química bastante estável, sendo capaz de se manter intacta mesmo quando exposta a condições extremas de pH e temperatura. Esta lectina preservou sua capacidade de se ligar à quitina além dos seus efeitos biológicos mesmo quando foi submetida aos testes de degradação proteolítica com pepsina, tripsina e quimiotripsina ou quando foi armazenada por período de 6 meses à temperatura ambiente (COELHO, 2013; PEREIRA, 2014).

Tratando-se dos efeitos biológicos da MoCBP4, estudos anteriores abordam significativas atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas em modelos animais. Inicialmente, foi demonstrada a capacidade desta proteína em reduzir consideravelmente as contorções abdominais induzidas por ácido acético em 98,9 e 52,9% quando administrada por via intraperitoneal e oral, respectivamente. Em adição, a MoCBP-4 foi capaz de reduzir em 89,1% a permeabilidade vascular causada por ácido acético (PEREIRA *et al.*, 2011). Seguindo-se a investigação em processos inflamatórios, em modelo de peritonite induzida por carragenina ou zymosan, o pré-tratamento dos animais com MoCBP4 por via endovenosa ou oral reduziu a migração de neutrófilo em 79% e 48%, respectivamente. Ademais, essa proteína foi capaz de reduzir os níveis séricos de IL1- β e incrementar os níveis de IL-10, não interferindo na concentração de TNF- α . Este efeito anti-inflamatório foi mantido mesmo quando a lectina foi aquecida a 100 °C por 1 hora, reafirmando a sua alta estabilidade estrutural frente à desnaturação térmica. Entretanto, ao ser incubada com o açúcar *N*-acetil-D-glicosamina, tal efeito anti-inflamatório foi perdido, comprovando que a sua atividade biológica é dependente do sítio de ligação a carboidrato (PEREIRA, 2014).

Em modelo de hipernocicepção inflamatória mecânica induzida por carragenina, a MoCBP4 na dose de 40 mg/kg foi capaz de atenuar a hipernocicepção e a atividade da mieloperoxidase (MPO). Por outro lado, MoCBP4 não interferiu na hipernocicepção causada por agentes que sensibilizam diretamente o nociceptor (prostaglandina E₂ e epinefrina), indicando que sua atividade antinociceptiva é dependente da sua interferência na resposta inflamatória (PEREIRA, 2014).

Diante dos resultados promissores da MoCBP4 em modelos experimentais clássicos da inflamação e nocicepção, seria inviável propor esta proteína como futura alternativa terapêutica sem antes realizar testes de toxicidade que comprovassem a sua segurança. Partindo deste princípio, Pereira (2014) realizou testes de toxicidades em camundongos de ambos os sexos, avaliou o possível efeito

citotóxico em células normais e tumorais e, também, a capacidade genotóxica desta lectina. Baseando-se nos guias 423 e 407 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), camundongos foram tratados por via oral com MoCBP4 nas doses 2000 mg/kg (dose única) e 100 mg/kg (dose diária durante 28 dias). Estes tratamentos não causaram mortalidade e nem modificaram consideravelmente parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais. Nos testes de citotoxicidade, a MoCBP4, mesmo na maior concentração (200 µg/ml), não causou hemólise e, no teste do MTT, não gerou danos em nenhuma das linhagens de células testadas (células leucêmicas, de câncer de cólon, de câncer de cérebro e linfócitos saudáveis). Dando prosseguimento aos testes de segurança, Pereira (2014) comprovou que a MoCBP4, nas concentrações de 25 e 50 µg/ml, não foi capaz de causar dano no DNA de células mononucleares saudáveis, evidenciando a não atividade genotóxica desta lectina.

3. Justificativa

A pancreatite aguda é uma doença inflamatória na qual cerca de 20% a 30% dos pacientes desenvolvem a forma mais grave da doença, que é caracterizada por complicações locais, como a necrose e a superinfecção, além de inflamação sistêmica incidindo em outros órgãos (VEGE, 2011). A pancreatite grave está relacionada com altas taxas de mortalidade quando associada a outras complicações, como insuficiência respiratória, renal e hepática, podendo chegar a 43%, 63% e 83% de mortalidade, respectivamente (HALONEN *et al.*, 2002; HAJJAL *et al.*, 2012). Apesar dos recentes avanços no diagnóstico e tratamento da pancreatite aguda, ainda não existem estratégias terapêuticas específicas e eficazes para a cura desta patologia. Tal situação justifica a enorme necessidade e interesse na realização de pesquisas que busquem descobrir e caracterizar compostos com potencial terapêutico que possam ser usados para seu tratamento.

A grande biodiversidade da flora brasileira tem sido utilizada por décadas como alternativa para a cura de múltiplas doenças, tanto na medicina popular como em aplicações clínicas cientificamente comprovadas. No entanto, ainda são poucas as informações quando se refere às caracterizações químicas e biológicas destas moléculas, o que abre perspectivas para a descoberta de novos compostos biologicamente ativos.

Um importante grupo de proteínas amplamente distribuído na natureza que vem despertando interesse de muitos pesquisadores é o das lectinas, proteínas de origem não imunogênica que se ligam especificamente e reversivelmente aos resíduos de carboidratos. Estas moléculas se destacam devido à grande diversidade de suas atividades biológicas. Dentre estas, as lectinas vegetais são vistas como possíveis ferramentas farmacológicas e potenciais alternativas para a utilização como medicamentos. Como grande vantagem da utilização de proteínas no desenvolvimento de fármacos, cita-se a possibilidade de produzi-las em escala industrial ou laboratorial, utilizando a tecnologia do DNA recombinante, uma preferência relevante para preservação da flora. Além disso, proteínas interagem de maneira específica com suas moléculas alvo, reduzindo possíveis efeitos adversos ao organismo.

Nosso grupo de pesquisa, em parceria com outros pesquisadores, há anos se dedica aos estudos das atividades biológicas de proteínas isoladas de plantas da

região Nordeste do Brasil, enfatizando as pesquisas nas áreas da inflamação e nocicepção. Seguindo nesta linha de investigação, foi demonstrado importante efeito anti-inflamatório e anti-nociceptivo de uma proteína ligante à quitina, MoCBP4, purificada a partir das sementes da planta *Moringa oleifera*. Esta proteína, ao ser administrada por via oral, endovenosa ou intraperitoneal, apresentou efeitos benéficos em modelos experimentais de inflamação aguda e dor inflamatória. Tais efeitos estão associados à redução da migração de neutrófilos e modulação das citocinas pró e anti-inflamatórias. Também foi comprovada a ausência de toxicidade da MoCBP4 quando administrada por via oral em altas doses por até 28 dias em camundongos (PEREIRA *et al.*, 2001; PEREIRA, 2014).

O presente estudo dará continuidade às investigações das atividades biológicas da lectina MoCBP4, explorando, especificamente, o seu efeito em modelo experimental de pancreatite aguda induzida por ceruleína. Ademais, este estudo visa investigar uma alternativa terapêutica com potencial utilização no tratamento da pancreatite aguda.

4. Objetivos:

4.1. Objetivo geral:

Avaliar o efeito da MoCBP4, uma lectina isolada da planta *Moringa oleifera*, sobre as alterações funcionais, inflamatórias e moleculares características da pancreatite aguda (PA) induzida por ceruleína em camundongos.

4.2. Objetivos específicos:

4.2.1. Investigar o efeito da MoCBP4 no modelo experimental de PA induzida por ceruleína em camundongos. Para tanto, o efeito desta proteína foi avaliado nos seguintes eventos relacionados à PA:

- a) Análise da função pancreática e hepática, por meio da atividade plasmática de marcadores enzimáticos (amilase, lipase e aminotransferases);
- b) Resposta inflamatória, por meio da determinação do edema pulmonar e da migração celular (neutrófilos) para o pâncreas, pulmão e fígado, *via* dosagem da mieloperoxidase (MPO);
- c) Alterações morfológicas, pela análise histopatológica do pâncreas, pulmão e fígado;
- d) Alterações no perfil de mediadores inflamatórios plasmáticos e teciduais, quantificando por ELISA citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), níveis de nitrito (NO₂⁻) no plasma e pâncreas e imunomarcação de COX-2, TNF α , NF κ -B e iNOS no pâncreas;
- e) Estresse oxidativo pela quantificação de grupos sulfidrílicos não-proteicos (NP-SH) e malonaldeído (MDA) no pâncreas;

4.2.2. Investigar o efeito da MoCBP4 sobre células acinares pancreáticas e neutrófilos de camundongos. Para tanto, foi avaliado o efeito desta proteína sobre a/o:

- a) Concentração de Ca^{2+} citosólico em células acinares pancreáticas estimuladas por colecistocinina-8 (CCK);
- b) Processo de necrose causado por ácido taurolitocólico em células acinares pancreáticas;
- c) Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos ativados por fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina) e PMA (acetato de miristato de forbol).

5. Materiais e métodos:

5.1. Purificação da MoCBP4

Todo o processo de purificação foi realizado no Laboratório de Toxinas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Celular – UFC, sob coordenação da Prof^a Dr^a Ilka Maria Vasconcelos, seguindo a metodologia descrita por Pereira e colaboradores (2011). Esta proteína purificada foi fornecida para o nosso laboratório na sua forma liofilizada.

Inicialmente, a farinha das sementes de *Moringa oleifera* foi colocada em contato com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M, na proporção 1:10 (m/v) e deixada sob agitação moderada por 4 horas a 4 °C. Em seguida, a suspensão foi filtrada e centrifugada a 15.000 x *g*, 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi filtrado e denominado extrato total. Este extrato foi então submetido à diálise exaustiva contra água destilada, em membrana de porosidade de 12 kDa, 4 °C, sob agitação moderada. A suspensão obtida foi centrifugada novamente. O material proteico presente no sobrenadante (fração albumínica) foi liofilizado e ressuspendido em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 e submetido à cromatografia de afinidade em matriz de quitina equilibrada com tampão esse mesmo tampão. As proteínas ligantes à quitina foram eluídas com ácido acético 0,05 M. As frações eluídas foram monitoradas por leitura da absorbância a 280 nm. O pico proveniente da eluição com ácido acético (P_{AC}) foi reunido e dialisado contra água destilada e liofilizado. O P_{AC} foi ressuspendido em 2 ml de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 e centrifugado a 8.000 x *g*, por 5 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi aplicado na coluna de matriz de CM-Sepharose™ *Fast Flow* (GE Helthcare), previamente equilibrada em mesmo tampão. As proteínas foram eluídas em fluxo contínuo de 30 ml/h, em frações de 3 ml. A cromatografia foi monitorada através de leitura da absorbância a 280 nm. Todas as proteínas eluídas receberam a denominação de MoCBP, acrescidas de um número na ordem em que foram eluídas. MoCBP4 foi o pico eluído com tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,6 M.

MoCBP4 liofilizada foi armazenada a 4 °C em microtubos de polietileno e solubilizada em solução salina estéril (0,9%) imediatamente antes de iniciar os procedimentos experimentais.

5.2. Animais experimentais

Os experimentos foram realizados utilizando-se camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) fêmeas, com peso entre 25 a 30 g, 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). Os ensaios *in vitro* foram realizados com camundongos CD1 fêmeas, entre 25 a 30 g, provenientes do Biotério da Universidade de Liverpool, Inglaterra. Todos foram acondicionados em gaiolas apropriadas, sob condições adequadas de luz (ciclo claro/escuro) e temperatura, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos.

Os protocolos utilizados neste trabalho estão de acordo com os padrões éticos estabelecidos pela Comissão de Ética da UFC sob o número de processo 132/14.

5.3. Fármacos e reagentes

- 1x RBC Solução de Lise (eBioscience, 00-4333-57);
- Ácido cítrico anidro (Grupo Química);
- Ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA;
- Ácido perclórico 70% (Cinética);
- Ácido tiobarbitúrico PA (Dinâmica);
- Albumina de soro bovino – BSA (Sigma, A7960);
- Álcool etílico absoluto (Synth);
- Azul de trypan 0,4% (Life technologies, T10282);
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma);
- Ceruleína (Sigma, C9026);
- Cetamina (Ketolar[®]);
- Cloreto de magnésio – MgCl₂ (Sigma, M1028);
- Cloreto de potássio – KCl (Sigma, P9333);

- Cloreto de sódio – NaCl (Sigma, S7653);
- Colagenase Purificada CLSPA (Worthington Biochemical Corporation);
- Colecistocinina – 8 - CCK (Sigma, C2177);
- DAPI (Vector Laboratories);
- D-Glucose (Sigma, G5767);
- Diaminobenzidina - DAB (DAKO);
- Dimetil sulfóxido – DMSO (Molecular probes)
- Eosina (Merck);
- Etellan (Merk);
- Fluoromonte (Sigma, F468);
- Forbol-12-miristato-13 acetato - PMA (Sigma, P1585);
- Formaldeído 40% (Reagen);
- Fosfato de potássio dibásico K_2HPO_4 (Synth);
- Fosfato de potássio monobásico KH_2PO_4 (Synth);
- Glutationa cristalizada em pó (Sigma, G425);
- Hematoxilina (Reagen);
- HEPES (4(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanolsulfônico ácido) (Sigma, H3375);
- Kit para determinação de alanina aminotransferase (Bio Advance);
- Kit para determinação de amilase (Labtest);
- Kit para determinação de aspartato aminotransferase (Bio Advance);
- Kit para determinação de lipase (Bioclin);
- Luminol 97% (Sigma, 123072);
- N-Formyl-Met-Leu-Phe – fMLP (Sigma, F3506);
- Nitrato redutase - NADPH (Sigma, N7265);
- O-dianisidina (Sigma);
- Percoll (Sigma, P1644);
- Peróxido de hidrogênio 30% – H_2O_2 (Sigma, 31642);
- PierceTM Horseradish Peroxidase (Life Technologies, 31490);
- RPMI 1640 Medium (Sigma, R7509);
- Sal dissódico de ácido taurolitocólico 3-sulfato – TLCS (Sigma)
- Solução HEPES – Na^+ - glicose (10 mM) , $CaCl_2$ (5 mM), NaCl (140 mM), $MgCl_2$ (1.13 mM), KCl (4.7 mM), HEPES (10 mM), água mili-Q.
- Solução tamponada com fosfato (PBS);
- Soro fisiológico 0,9% - Solução salina (Farmace);

- Streptavidina – HRP (R&D System, DY998)
- Tapsigargina (Sigma, T9033);
- Tetrametoxi-propano – TMP (Sigma, 108383);
- Xilazina (Rompun[®]);
- Xilol (Reagen);

ANTICORPOS

- ABC Staining System (Santa Cruz Biotechnology, SC2018);
- ABC Staining System (Santa Cruz Biotechnology, SC2023);
- Anticorpo biotilado secundário de cabra Anti-IL1- β (R&D Systems, Dy 401);
- Anticorpo biotilado secundário de cabra Anti-IL6 (R&D Systems, Dy 406);
- Anticorpo biotilado secundário de cabra Anti-TNF- α (R&D Systems, Dy 410);
- Anticorpo primário monoclonal de coelho iNOS (Abcam, ab136918);
- Anticorpo primário policlonal de cabra Anti-COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, SC-1746);
- Anticorpo primário policlonal de cabra Anti-TNF- α (R&D Systems, Dy 410);
- Anticorpo primário policlonal de coelho Anti-NF κ B-p50 (Santa Cruz Biotechnology, SC-114);
- Anticorpo primário policlonal de coelho Anti-TNF- α (Abcam, ab6671);
- Anticorpo primário policlonal de rato Anti-IL1- β (R&D Systems, Dy 401);
- Anticorpo primário policlonal de rato Anti-IL6 (R&D Systems, Dy 406);
- Anticorpo secundário de cabra AlexaFluor 488 (Life Technologies, A11008);

MARCADORES FLUORESCENTES

- Fluo4 – AM (Sigma, F14201);
- Hoechst 33342 (Molecular probes, H1399);
- Iodeto de propídio (Sigma, P4170);

5.4. Equipamentos e materiais

- Agitador de tubos tipo Vortex (Labnet);
- Balança analítica AY220(Shimadzu);
- Balança não analítica SF 400 (Electronic);
- Banho maria (Quimis);
- Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys;

- Estufa com temperatura controlada MA033 (Marconi);
- Homogeneizador de tecidos Ultra 80 (Ultra Stirrer)
- Lâmina lisa para microscopia 26 X 76 mm;
- Lâminas silanizadas (Line™ Precleaned)
- Lamínulas 24X32 mm;
- Leitor de placas Expert plus (Asys);
- Leitor de microplaca POLARstar Omega (BMG Lantech);
- Material cirúrgico;
- Medidor de pH AJX-512 (AJ Micronal);
- Microcentrífuga refrigerada NT805 (Nova Tecnica)
- Microscópio Confocal Fluo View™ 1000 (Olympus);
- Microscópio Confocal LSM510 (Zeiss);
- Microscópio Óptico Primo Star (Zeiss).

5.5. Indução da pancreatite aguda por ceruleína em camundongos

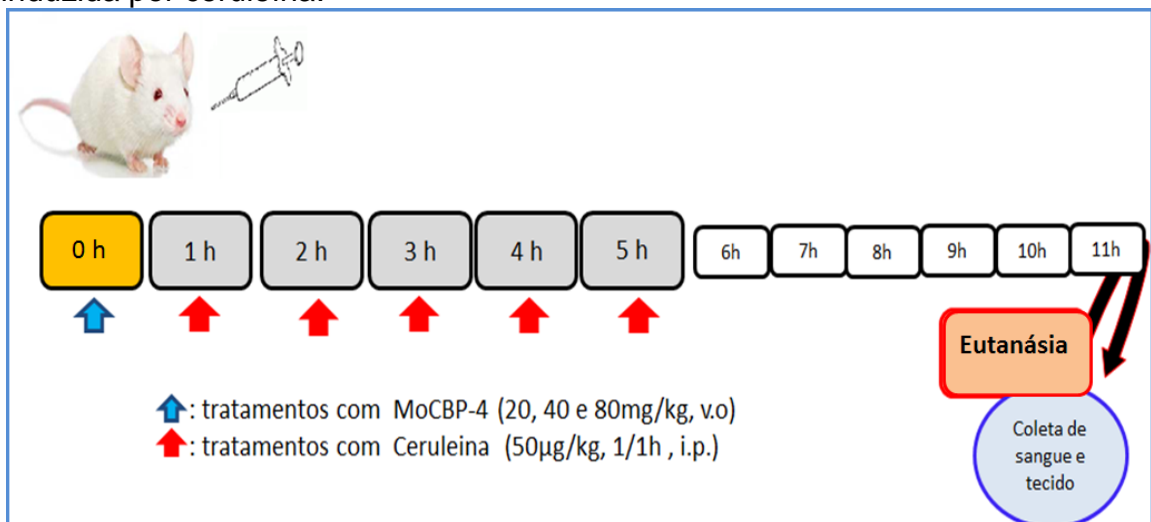
A pancreatite aguda foi induzida conforme descrito por Malleo e colaboradores (2008). Para tanto, os camundongos receberam, por via intraperitoneal (i.p.), cinco injeções de ceruleína (50 µg/kg, solubilizada em NaCl 0,9% estéril) com intervalos de 1 hora entre as administrações. Após 6 horas da última administração de ceruleína, os animais foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e cetamina 100 mg/kg, por via subcutânea) e amostras de sangue periférico foram coletadas com auxílio de microcapilares heparinizados através da punção da artéria ocular, com posterior centrifugação para obtenção do plasma a ser utilizado para as avaliações bioquímicas (Figura 5). Em seguida, os animais foram sacrificados, ainda sob anestesia, por deslocamento cervical, sendo os órgãos pâncreas, pulmão e fígado retirados, pesados, processados ou armazenados para diferentes protocolos descritos a seguir.

5.6. Grupos experimentais e protocolos de tratamentos:

Os animais foram divididos em cinco grupos (n= 6-8) distintos de acordo com os tratamentos:

1. **Grupo controle salina:** tratamento com solução salina estéril (5 x NaCl 0,9%) por via intraperitoneal (i.p.);
2. **Grupo controle ceruleína:** tratamento (i.p.) com ceruleína (50 µg/kg x 5, de 1 em 1h);
3. **Grupo MoCBP4 20 mg/kg + ceruleína:** tratamento por via oral (v.o.) com MoCBP4 (20 mg/kg, NaCl 0,9%) 1 hora antes da primeira administração de ceruleína (50 µg/kg x 5, de 1 em 1h, i.p.);
4. **Grupo MoCBP4 40 mg/kg + ceruleína:** tratamento (v.o.) com MoCBP4 (40 mg/kg, NaCl 0,9%) 1 hora antes da primeira administração de ceruleína (50 µg/kg x 5, de 1 em 1h, i.p.);
5. **Grupo MoCBP4 80 mg/kg + ceruleína:** tratamento (v.o.) com MoCBP4 (80 mg/kg, NaCl 0,9%) 1 hora antes da primeira administração (i.p.) de ceruleína (50 µg/kg x 5, de 1 em 1h);

Figura 5: Esquema de tratamento dos animais no modelo de pancreatite aguda induzida por ceruleína.



5.7. Parâmetros avaliados no modelo *in vivo*

5.7.1. Determinação da atividade plasmática das enzimas amilase, lipase, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)

A atividade das enzimas foi determinada no plasma obtido por centrifugação (3000 g/ 10 min a 4 °C) do sangue dos animais, coletado conforme descrito no item 5.5. As dosagens foram realizadas no mesmo dia do procedimento por métodos colorimétricos, seguindo metodologias descritas pelos fabricantes dos “kits” comerciais para determinação da amilase (Labtest), lipase (Bioclin), AST e ALT (Bio Advance).

5.7.2. Determinação do edema pancreático

Após a eutanásia dos animais (item 5.5), o pâncreas foi retirado para pesagem em balança analítica. A relação entre o peso do pâncreas (mg) e o peso corpóreo do animal (g) foi utilizada para a determinação do edema pancreático (mg/g) (SZABOLCS *et al.*, 2006).

5.7.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) no pâncreas, pulmão e fígado

A atividade da MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, foi utilizada como marcador da presença de neutrófilos nos tecidos do pâncreas, pulmão e fígado, e determinada por método colorimétrico em leitor de placas. Para tanto, após o sacrifício dos animais, uma porção de cada órgão foi coletada e incubada em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), na proporção de 50 mg de tecido por mL de HTAB, homogeneizada e centrifugada (1500 g/20 min a 4 °C). O sobrenadante foi transferido para um eppendorf e novamente centrifugado (10 min) para remoção de contaminantes. Após plaqueamento de 7 µL do sobrenadante (placas de 96 poços), 200 µl da solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15 µl H₂O₂ 1%; 3 ml tampão

fosfato; 27 ml H₂O) foram adicionados e lidos a 460 nm (t₀=0 min e t₅=5 min). A mudança na absorbância foi obtida, comparada com uma curva padrão de neutrófilos e expressa como atividade de MPO (BRADLEY *et al.*, 1982).

5.7.4. Análise histológica de pâncreas, pulmão e fígado

Imediatamente após a eutanásia dos animais, os órgãos foram removidos cuidadosamente e colocados em formol a 10%. Decorridas 24 horas, estes foram retirados do formol e imersos em álcool 70° e posteriormente processados para inclusão em parafinaparafinizados, cortados em seções de 5 µm, corados pelo método HE (hematoxilina-eosina) e avaliadas em microscopia óptica por patologista (cego).

Foram analisadas as alterações morfológicas características da pancreatite aguda como: edema, infiltrado de células inflamatórias e necrose. O grau de edema foi determinado utilizando uma escala de 0 a 3 (0= ausente, 1 = edema interlobular, 2= edema interlobular e moderado edema intralobular, e 3 = edema interlobular e intenso edema intralobular). A presença de infiltrado de polimorfonucleares (PMN) foi também analisada obedecendo escala de 0 a 3 (0= ausente 1= infiltração perivascular escassa, 2= moderada infiltração perivascular e escassa infiltração difusa, e 3 = abundante infiltração difusa). O grau de necrose foi baseado na porcentagem da áreas acometida: 0= ausente, 1= presença de necrose periductal (≤ 5%), 2= necrose focal (6 a 20%), e 3= necrose difusa no parênquima (21 – 50%) (LAETHEM *et al.*, 1995).

5.7.5. Dosagem de citocinas no plasma e no pâncreas

As concentrações de TNF-α, IL-1β e IL-6 foram determinadas em amostras de plasma e de pâncreas coletados após 6h da última injeção de ceruleína. Estas amostras foram estocadas em freezer -80 °C até o momento deste ensaio.

Para o ensaio, o tecido coletado foi homogeneizado em tampão PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄), pH 7,2 – 7,4 e processados como descrito por Safieh-Garabedian e col. (1995). A detecção de TNF-α, IL-1β e IL-6 foi determinada no plasma e no sobrenadante do macerado da amostra por ELISA (CUNHA *et al.*, 1993). Placas de 96 poços foram incubadas por 12 h a 4 °C com

anticorpo anti-TNF- α , anti-IL-1 β e anti-IL-6 (4 $\mu\text{g/ml}$, DuoSet ELISA Development kit R&D Systems Catalog DY501 e DY510 respectivamente). Após sensibilização das placas, as amostras foram adicionadas em duplicata e a curva padrão foi adicionada em várias diluições e incubadas por 2 h a 4 °C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05% SIGMA) e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti-TNF- α , anti-IL-1 β e anti-IL-6 (1:1000 com BSA/Tween 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1 h, as placas foram lavadas e 50 μL do complexo HRP-streptavidina diluído 1:5000 foram adicionados. Decorridos 15 minutos, o reagente de cor tetrametilbenzidina (TMB, 50 μl) foi adicionado e as placas foram incubadas na ausência de luz a 37 °C por 15 a 20 min. A reação enzimática foi interrompida com H_2SO_4 (1M) e a densidade óptica medida a 490 nm em espectrofotômetro. As concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-6 contidas nas amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão com 11 pontos, obtida por diluição seriada, sendo as concentrações iniciais de 1000 pg/ml . Para o plasma, o resultado foi expresso em picograma (pg) de citocina/ml e para o pâncreas, em pg de citocina/mg de tecido.

5.7.6. Quantificação de marcadores do estresse oxidativo no pâncreas

A) Grupos sulfidrílicos não proteicos (NP-SH)

Os pâncreas dos animais foram removidos e homogeneizados a 10% com solução gelada de EDTA 0,02M (100 mg de tecido/1 mL de EDTA sódico 0,02M). Adicionou-se 60 μl de ácido tricloroacético (10%) a 40 μl do homogenato recém preparado e, em seguida, foi centrifugado (3000 g/15 minutos a 4 °C). Na fase seguinte, 60 μl do sobrenadante foram colocados em poço da microplaca e a eles foram adicionados 102 μl de uma solução recém preparada com tampão Tris-HCl (0,4 M, pH 8,9) e com ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB, 0,01 M) numa proporção de 1000 μl :26 μl , respectivamente. O material foi agitado por 3 minutos e a absorbância imediatamente medida a 412 nm. Não foi adicionado homogenato no "branco". A concentração de NP-SH foi calculada através de uma curva padrão de glutathiona reduzida (GSH), e os resultados foram expressos como μg de NP-SH/g de tecido (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

B) Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica no pâncreas foi determinada por estimativa do malondialdeído (MDA) usando o teste do ácido tiobarbitúrico (AGAR *et al.*, 1999). As amostras de tecido pancreático foram homogeneizadas a 10% em tampão KCl 0,15M (pH 7,4) (100 mg de tecido/1 mL de tampão KCl 0,15 M). O homogenato (250 μ l) foi incubado em banho-maria a 37 °C durante 1 h. Após a incubação, adicionou-se 400 μ l de ácido perclórico 35% e as amostras foram centrifugadas (4000 g/ 15 min). Adicionou-se 200 μ l de ácido tiobarbitúrico 0,8% a 600 μ l do sobrenadante. A mistura foi colocada em banho-maria a 95-100 °C por 30 min. Ao terminar a fase anterior, a leitura da absorbância foi realizada a 532 nm . A curva padrão foi obtida usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (AGAR *et al.*, 1999). Os resultados foram expressos como nanomoles de MDA por grama de tecido (nmol/g tecido).

5.7.7. Quantificação de nitrito (NO_2^-) nos plasma e pâncreas

O plasma e o homogenato do tecido pancreático foram utilizados para a determinação indireta de NO mensurado a partir dos níveis de nitrato, os quais foram determinados através da conversão de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), pela ação da enzima nitrato-redutase e o nitrito quantificado pela reação de Griess (CHEN *et al.*, 2000). Para o ensaio, 40 μ l do plasma e sobrenadante do homogenato foram incubados durante 12 h com 40 μ l de tampão contendo a enzima nitrato redutase em placas de 96 poços. Uma curva padrão de nitrato de sódio (0,78-200 μ M) também 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 μ l 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 μ M de NO_2^- .

5.7.8. Marcação de COX-2 e TNF- α no pâncreas por imunohistoquímica

Foram realizadas as imunohistoquímicas para COX-2 e TNF- α no tecido pancreático que foi retirado e fixado em formol tamponado a 10%. Decorridas 24 horas, os pâncreas foram retirados do formol e colocados em álcool 70^o e posteriormente parafinizados. Em seguida, foram realizados cortes histológicos de 4 a 5 μ m de espessura e colocados em lâminas silanizadas. Para iniciar o ensaio, as lâminas foram colocadas em estufa a 70 °C durante 60 a 90 min e após a desparafinização do tecido, seguiu-se com a hidratação seriada com xilol, álcool, água. No passo seguinte, foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato (pH= 6.0) utilizando banho-maria (80 °C/ 20 min). Em seguida, após resfriar sobre a bancada, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% por 10 min. Posteriormente, após lavagem (PBS 10x/ 5 min), as laminas foram incubadas com BSA 2% (30 min) para bloquear ligações inespecíficas. Em seguida, as lâminas foram incubadas overnight (4 a 8 °C) com o anticorpo primário para detecção de COX-2 (Santa Cruz) e TNF- α , na diluição de 1:100 em diluente BSA 1%. A segunda etapa do ensaio foi iniciada com a remoção dos anticorpos primários seguida de três lavagens (PBS 10x/ 5 min) e incubação com o anticorpo secundário biotinilado (Santa-Cruz), na diluição de 1:100, por 1 h, à temperatura ambiente. Após a remoção do excesso de anticorpo, foi incubado com o complexo streptavidina-biotina-peroxidase (Santa Cruz) diluído em PBS, por 30 min. Após a remoção do complexo e a lavagem com tampão, a reação foi revelada em sala escura utilizando o cromógeno 3,3 – diaminobenzidina (DAB, DAKO), à temperatura ambiente, por 5 min. Para todas as imunohistoquímicas, a reação foi interrompida pela lavagem com água por 5 min. A contracoloração foi feita com hematoxilina de Mayer (Invision Flex-Dako), por 3 min, seguida de banho com solução Scott, sendo o excesso retirado com água corrente. Finalmente, as mesmas foram submetidas à desidratação gradativa com álcoois 50^o, 70^o, 90^o, álcool absoluto, xilol e montadas com lamínulas em Entellan. Os controles negativos foram processados simultaneamente, como descrito acima, e o anticorpo primário foi substituído por BSA 1%.

Para a análise qualitativa, foram fotografados 10 campos distintos de cada corte do tecido (aumento de 200x). Em seguida, foi utilizado o programa Image J-NIH para quantificar a área marcada (em pixels) pela maior saturação da cor

associada ao DAB (coloração marrom). Por fim, foi calculada a média para cada corte analisado.

5.7.9. Marcação de iNOS e NF-κB no pâncreas por imunofluorescência

Após remoção dos pâncreas, estes foram processados de forma semelhante à técnica da imunohistoquímica. A recuperação antigênica ocorreu com tampão citrato (pH= 6.0) utilizando banho-maria (80 °C/ 20 min). Na imunofluorescência não foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena. Foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas com soro de cabra 10% (diluído em PBS 1x e Triton-X 1%) por 2 h sobre a bancada. Após lavagem (PBS 10x/ 5 min/ 3x), as lâminas foram incubadas overnight (4 °C) com o anticorpo primário para detecção de NF-κB (Santa Cruz) e iNOS (Abcam) nas diluições de 1:100 e 1:200, respectivamente, em diluente Triton-X 0,5%. A segunda etapa do ensaio se iniciou com a remoção dos anticorpos primários seguida de três lavagens (PBS 10x/ 5 min) e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo secundário AlexaFluor 488 (Life Technologies) na diluição de 1:500 em diluente Triton-X 0,5%. Em seguida, após lavagem (PBS 10x/ 5 min/ 3x), os cortes foram incubados por 15 minutos com DAPI (Vector Laboratories) na diluição de 1:5000 em diluente PBS 10x. Finalmente, as lâminas foram montadas com lamínulas em Fluoromonte (Sigma). Os controles negativos foram processados simultaneamente, como descrito acima, e o anticorpo primário foi substituído por Triton-X 0,5%. Em microscópio digital de fluorescência Cytation Cell (Biotek®) o DAPI e o AlexaFluor 488 foram excitados com laser de xenônio a 405nm e 490nm, enquanto que a luz emitida coletada foi a 450nm e 525, respectivamente. Os cortes dos tecidos pancreáticos que foram utilizados para investigação de iNOS e TNF-κB foram avaliados qualitativamente de acordo com a imunofluorescência citoplasmática e nuclear, respectivamente.

5.8. Parâmetros avaliados *in vitro*

5.8.1. Isolamento das células acinares a partir do pâncreas de camundongos:

Camundongos CD1 adultos e saudáveis foram eutanasiados como descrito anteriormente, e logo o pâncreas foi removido e lavado duas vezes em 4 ml de tampão Hepes-Na⁺. Em seguida, com uma seringa de 1 ml, uma solução de colagenase (200 U/ml/36,5 °C) foi injetada em diferentes regiões do pâncreas, criando bolhas e distendendo o tecido. Imediatamente, esta solução enzimática e o tecido pancreático foram colocados em banho-maria sob agitação a 36,5 °C, durante 17 min. Em seguida, o pâncreas foi retirado da solução de colagenase e lavado com tampão Hepes-Na⁺. O passo seguinte foi caracterizado pela desintegração mecânica do pâncreas com auxílio de ponteiros e de pipetas, mas antes o pâncreas foi colocado em tubo falcon de 15 ml e adicionado 3 – 4 ml de tampão Hepes-Na⁺. A cada pipetagem realizada o tecido foi sugado contra o orifício da ponteira. Esse desgaste mecânico fez com houvesse a desintegração tecidual. Após 16-20 pipetagens, completou-se o volume do tubo plástico (15 ml) com tampão Hepes-Na⁺ e em seguida, a suspensão foi centrifugada (600 RPM/ 2 min). Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se o processo de desintegração mais 2 vezes, seguido de centrifugação, totalizando 3 centrifugações. Ao final, o precipitado foi ressuspenso em 2 ml de tampão Hepes – Na⁺ e as células isoladas estavam prontas para uso (CRIDDLE *et al.*, 2006).

Todo o processo de preparação das células acinares pancreáticas foi realizado à temperatura ambiente e estas células foram utilizadas dentro de 4 horas após isolamento.

5.8.2. Isolamento de neutrófilos a partir da medula óssea de camundongos

Camundongos CD1 adultos e saudáveis foram eutanasiados e em seguida o fêmur e a tíbia removidos para realização do lavado medular. Para tanto, as epífises foram cortadas e PBS 1% foi injetado pelas extremidades ósseas com auxílio de seringa de 10 ml e agulha 13 x 4,5. Entre a seringa e agulha foi colocado filtro 10 mm. Esse procedimento foi realizado até completar volume de 15 ml do tubo plástico estéril. Seguiu-se com centrifugação (600 x g/5 min a 4 °C), com prévia programação

do equipamento para desacelerar lentamente com o intuito de evitar ativação precoce destas células. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente com auxílio de uma pipeta de Pasteur. O precipitado foi ressuspensão gentilmente em 5 ml de PBS 1x, seguido de filtração (tamis 70 μm) e adição deste filtrado sobre a solução Percoll 62,5% (diluído em PBS). Foi centrifugado mais uma vez (1500 x g/ 20 min a 4 °C). Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensão em 12 ml de PBS 1x. Seguiu-se com mais um ciclo de centrifugação (600 x g/ 5min a 4 °C). Descartou-se o sobrenadante, adicionou 5 ml de solução tampão de lise (1x RBC Lysis buffer solution, Sigma) e colocou-se em homogeneizador em velocidade lenta por 5 min. Ao final, a suspensão foi centrifugada novamente (600 x g/5 min a 4 °C). O sobrenadante foi descartado e sobre a precipitado foi adicionado 2 a 3 ml de RPMI 1640 medium. Nesta suspensão, foi realizada a contagem dos neutrófilos totais utilizando azul de Trypan 0,4% (1:1) em contador automático. Para o ensaio com neutrófilos, a concentração final da suspensão celular foi ajustada com adição de RPMI 1649 medium para aproximadamente $2,4 \times 10^6$ células/ml (BOYUM, 1968).

5.8.3. Análise dos níveis de Ca^{2+} no citosol de células acinares estimuladas por colecistocinina-8 (CCK)

Imediatamente após a preparação das células acinares pancreáticas, adicionou-se 5 μl de Fluo4-AM (3 μM) a 2 ml da suspensão celular. Protegida da luz, esta suspensão ficou sob agitação por 30 min a temperatura ambiente. Ao final deste processo, o volume foi completado para 15 ml com tampão HEPES- Na^+ e em seguida centrifugou-se a suspensão (600 rpm/2 min). O sobrenadante foi descartado e 2 ml da tampão HEPES- Na^+ foram adicionados para ressuspender o precipitado. Esta suspensão celular permaneceu protegida da luz até o final da sua utilização.

A solução de colecistocinina-8 (CCK) 10 nM foi preparada em tampão HEPES- Na^+ - CaCl_2 5 mM. A partir desta solução de CCK 10 nM, foram preparadas as soluções de MoCBP4 nas concentrações 0,1 μM , 1 μM e 10 μM .

Em sala escura a 35 °C foi iniciado o ensaio. Foram focalizados cachos de células acinares (entre 2 a 4 células) em microscópio confocal Zeiss sistema LSM510. Fluo4-AM foi excitado por laser argônio a 488 nm e a luz emitida coletada a 505-550 nm. A análise do íon cálcio (Ca^{2+}) se deu através do registro da

fluorescência em uma corrida contínua totalizando 960 segundos, com intervalos de tempo padronizados para a adição de cada solução sobre as células focalizadas. De 0 a 180 segundos, adicionou-se apenas solução Hepes- Na^+ sobre as células (fluorescência basal). De 181 a 480 segundos foi adicionado apenas solução de CCK 10 nM. De 481 a 780 segundos foi adicionado solução de CCK 10 nM + MoCBP4. Por fim, de 781 a 960 adicionou-se apenas solução Hepes- Na^+ . A cada corrida (0 a 960s), foi analisada uma concentração de MoCBP4 por vez. Esta análise foi repetida em várias células de pelo menos três animais distintos. Os resultados foram expressos através da razão F/F_0 , em que F representa a fluorescência registrada a cada tempo e F_0 a média das fluorescências registradas no intervalo de tempo 380 a 480 segundos. A variação (Δ) foi calculada a partir da diferença entre as fluorescências registradas nos tempos 170 e 780 segundos.

5.8.4. Avaliação da necrose causada por ácido taurolitocólico (TLC-S) em células acinares

A suspensão celular recém-preparada, como descrita anteriormente (5.8.1), foi distribuída em volumes iguais em quatro microtubos do tipo eppendorfes, cada um representando um grupo experimental. À temperatura ambiente e sob agitação leve, as suspensões celulares receberam tais tratamentos:

- 1) incubação apenas com solução salina estéril (NaCl 0,9%) por 1h:30min;
- 2) Incubação com TLC-S 500 μM por 30 min;
- 3) Incubação com MoCBP4 1 μM por 1 h e em seguida com TLC-S 500 μM por 30 min.

Ao final de cada tratamento, todos os grupos foram incubados por 5 min com o marcador nuclear, Hoechst 33342 (50 $\mu\text{g/ml}$), e o marcador de necrose, Iodeto de Propídeo (10 mg/ml, IP). Ao final desta última etapa, as suspensões foram centrifugadas (1000 rpm/ 1 min à temperatura ambiente) e o precipitado ressuspenso em tampão Hepes- Na^+ (CRIDLLE *et al.*, 2006). Em seguida, as células foram analisadas em microscópio confocal (Olympus). A fluorescência de Hoechst 33342 (Excitação/emissão: 488/560-660) e IP (Excitação/emissão: 405/425-475) foram obtidas utilizando a objetiva de 40x. De cada grupo foram capturadas imagens

de 10 campos distintos, a partir das quais foram contabilizadas todas as células marcadas com Hoechst 33342 e aquelas marcadas com IP. O percentual de necrose foi calculado através da razão entre número de células em necrose (marcadas com IP) e o número de células totais (marcadas com Hoechst 33342). Este ensaio foi realizado com três animais distintos, totalizando 2373 células analisadas.

5.8.5. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos

A oxidação do luminol (5-Amino-2,3-dihidro- 1,4-phthalazinedione) em meio aquoso e, conseqüentemente, sua quimiluminescência, pode ser obtida por vários agentes oxidantes como as EROs (peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, radical ânion superóxido e mesmo o oxigênio singlete), sempre na presença de um catalisador, como íons inorgânicos, e enzimas como peroxidase de raiz forte (HRP) e MPO. Em soluções tamponadas e na presença de enzimas como a HRP ou MPO, o monoânion luminol é univalentemente oxidado por uma variedade de oxidantes e, posteriormente, o radical superóxido é introduzido, produzindo um alfa-hidroxi-peróxido, com posterior adição intramolecular e formação de um endoperóxido. Após liberação do N₂, forma-se o aminoftalato no estado eletronicamente excitado que, ao decair ao seu estado fundamental, produz luminescência (SANTOS, SANTOS, COSTA, 1993). A quimiluminescência dependente de luminol é utilizada para a detecção de todas as EROs formadas no estresse oxidativo, indistintamente.

Para o ensaio, os neutrófilos recém-isolados e suspensos em meio RPMI 1640 foram plaqueados (200 µl) em microplacas de 96 poços onde cada poço representou um grupo experimental distinto. Em seqüência, foram adicionados 25 µL de HRP (0,25 g/ml em PBS) e 25 µl de luminol (0,01 µg/ml em PBS) em todos os poços. Em seguida foi adicionada MoCBP4 nas concentrações de 0,1 µM, 1 µM e 10 µM (em PBS) em seus devidos poços identificados. Após 10 minutos da adição da lectina, foram colocados 2,5 µl de cada estímulo fMLP (1 µM) e PMA (50 nM). Imediatamente a placa foi colocada em leitor de microplaca e a quimiluminescência foi registrada até completar 30 min de análise (MÓCSAI *et al.*, 1999; HELEN; CLAES, 1996). O ensaio foi repetido quatro vezes nas mesmas condições

experimentais, utilizando-se quatro animais distintos. Os resultados foram expressos através do cálculo da área sob a curva.

5.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo-máximo, variáveis sem distribuição normal). Foram utilizados a análise de variância (ANOVA) ou teste Kruskal Wallis conforme os dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente. Quando utilizou ANOVA, foi aplicado o teste de comparações múltiplas (teste de Newman-Keuls), baseando-se na continuidade das variáveis em análise e, quando utilizado Kruskal Wallis, seguiu-se o teste de Dunn, sendo as diferenças consideradas significantes quando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada em software GraphPad Prism®, versão 5.0.

6. Resultados

6.1. Efeito da lectina MoCBP4 sobre a atividade plasmática das enzimas amilase e lipase:

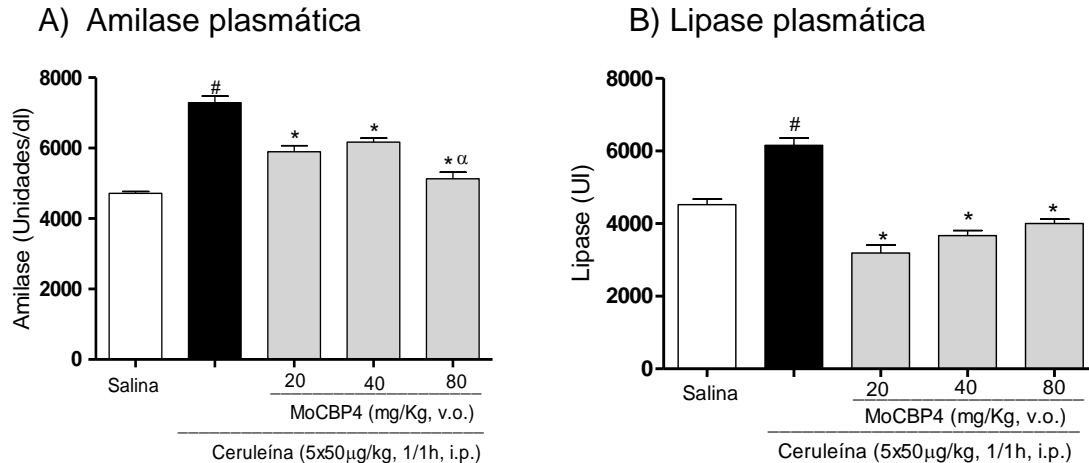
O tratamento intraperitoenal dos animais com ceruleína induziu disfunção pancreática evidenciada pelo aumento nas atividades plasmáticas das enzimas pancreáticas. Enquanto o grupo Salina apresentou atividade da amilase de 4715 U/dL \pm 55,20 e da lipase de 4521UI \pm 153,3, o grupo Ceruleína apresentou, respectivamente, 7168 U/dL \pm 191,4 e 6156 UI \pm 120,2 (Figura 6).

O tratamento com MoCBP4 nas doses de 20, 40, e 80 mg/kg reduziu as atividades da amilase para 5894 U/dL \pm 178,1; 6173 U/dL \pm 107,9; 5127 U/dL \pm 186,7 U/dL correspondendo uma redução de 18%, 14% e 28%, respectivamente, quando comparadas ao grupo ceruleína.

Com relação à atividade de lipase, a MoCBP4 nas doses de 20, 40 e 80 mg/kg também foi capaz de reduzir esta atividade para 3193 UI \pm 220,2; 3663 UI \pm 145,8; 4001 UI \pm 120,2 UI correspondendo uma redução de 51%, 40%, e 35%, respectivamente, quando comparadas ao grupo Ceruleína.

Sobre a atividade da lipase, não houve diferença significativa entres as doses de MoCBP4, em contrapartida a dose de 80 mg/kg de MoCBP4 foi mais efetiva em reduzir a atividade de amilase quando comparada às outras doses menores.

Figura 6: Lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* (MoCBP4) reduz atividade plasmática da amilase (A) e lipase (B) em resposta à administração da ceruleína em camundongos com pancreatite aguda.



Animais foram tratados com salina (v.o.) ou MoCBP4 (20, 40 ou 80 mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração de ceruleína (5 x 50µg/kg, 1/1h, i.p.). Após 6h da última administração de ceruleína, os animais foram eutanasiados e o plasma coletado para análise das atividades enzimáticas. Resultados são expressos como a média da atividade enzimática em Unidades/dL ou UI ± E.P.M. de 6 animais por grupo. # p<0,05 indica diferença estatística comparado com grupo Salina, * p<0,05 com o grupo Ceruleína e α p<0,05 com os grupos MoCBP4 20 e 40mg/kg. (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

6.2. Efeito da lectina MoCBP4 sobre as enzimas plasmáticas marcadoras da função hepática, aspartato e alanina aminotransferases (AST e ALT):

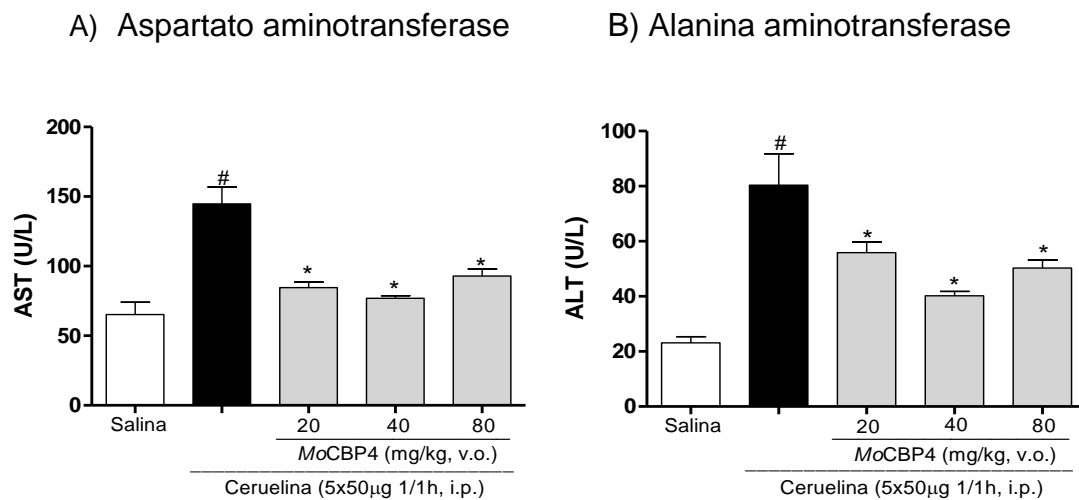
O tratamento intraperitoneal dos animais com ceruleína, 6 horas após, induziu também disfunção hepática comprovada pelo aumento significativo das atividades plasmáticas das aminotransferases AST e ALT. Enquanto o grupo Salina apresentou atividade da AST de 62,2 U/L ± 8,8 e da ALT de 23,1 U/L ± 2,2, o grupo Ceruleína apresentou, respectivamente, 144,8 U/L ± 12,2 e 80,4 U/L ± 11,39 (Figura 7).

O pré-tratamento com MoCBP4 nas doses 20, 40, e 80 mg/kg reduziu as atividades de AST para 84,6 U/L ± 3,9; 76,8 U/L ± 1,9; 92,9 U/L ± 5,2 correspondendo uma redução de 42%, 47% e 36%, respectivamente, quando comparadas ao grupo Ceruleína.

Quanto à atividade da enzima ALT, MoCBP4 nas doses de 20, 40 e 80 mg/kg também reduziu para 55,9 U/L ± 3,8; 40,2 U/L ± 1,6; 50,3 U/L ± 2,9, correspondendo

uma redução de 30%, 50% e 37%, respectivamente, quando comparadas ao grupo ceruleína ($80,4 \pm 11,39$). Nenhuma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as doses da lectina foi observada.

Figura 7: Lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* (MoCBP4) reduz atividade plasmáticas de AST (A) e ALT (B) em resposta à administração da ceruleína em camundongos com pancreatite aguda.

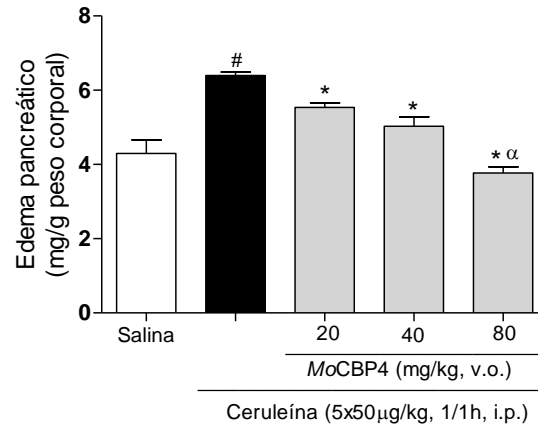


Animais foram tratados com salina (v.o.) ou MoCBP4 (20, 40 ou 80 mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração de ceruleína (5 x 50µg/kg, 1/1h, i.p.). Após 6 h da última administração de ceruleína, os animais foram sacrificados e o plasma foi coletado para análise. Resultados são expressos como a média da atividade \pm E.P.M. de 6 animais por grupo. # $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com grupo Salina e * $p < 0,05$ com o grupo Ceruleína. (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

6.3. Efeito da lectina MoCBP4 sobre o edema pancreático:

Inicialmente foi avaliado o efeito da MoCBP4 sobre o edema pancreático causado por ceruleína. Camundongos submetidos apenas ao tratamento com ceruleína (grupo Ceruleína) apresentaram aumento do edema pancreático quando comparados aqueles animais que receberam apenas salina (grupo Salina). O pré-tratamento com MoCBP4, nas doses de 20, 40 e 80 mg/kg, reduziu o edema pancreático em 13%, 21% e 41%, respectivamente, em comparação ao grupo Ceruleína. Destaca-se a dose de 80 mg/kg que apresentou melhor efeito quando comparada às doses de 20 e 40 mg/kg (Figura 8).

Figura 8: Lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* (MoCBP4) reduz o edema pancreático causado por ceruleína em camundongos.

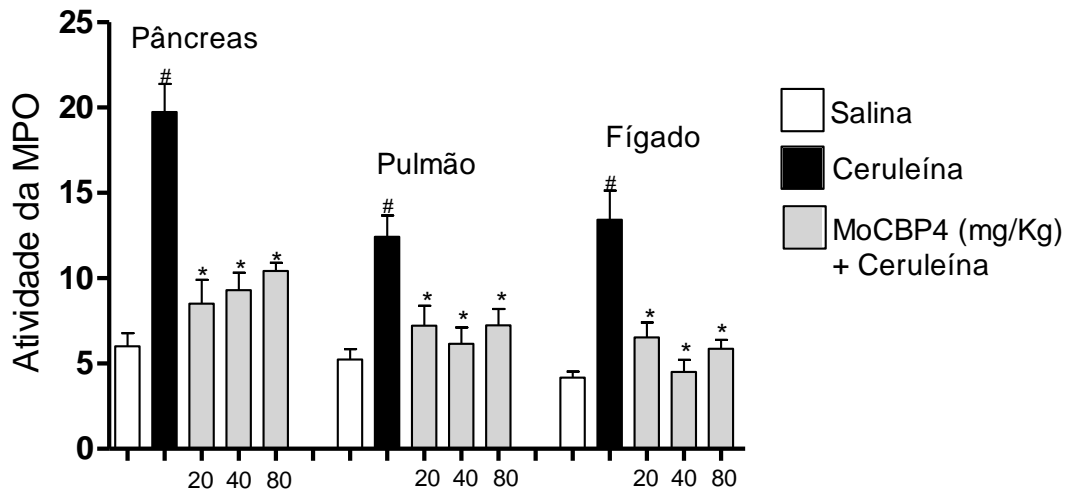


Animais foram eutanasiados com salina (v.o.) ou MoCBP4 (20, 40 ou 80 mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração da ceruleína (5 x 50µg/kg, 1/1h, i.p.). Após 6 h da última administração de ceruleína, os animais foram sacrificados e o pâncreas foi pesado. Resultados são expressos como a média do peso pâncreas/peso animal em mg/g ± E.P.M. de 6 animais por grupo. # p<0,05 indica diferença estatística comparado com grupo Salina, * p<0,05 com o grupo Ceruleína e α p<0,05 com os grupos MoCBP4 20 e 40 mg/kg (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

6.4. Efeito da lectina MoCBP4 sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) no pâncreas, pulmão e fígado

A migração de neutrófilos para os tecidos foi mensurada indiretamente através da atividade da MPO. A administração i.p. de ceruleína provocou significativo acúmulo de neutrófilos no pâncreas, pulmão e fígado quando em comparação ao grupo controle salina. MoCBP4 nas doses de 20, 40 e 80 mg/kg foi efetiva em reduzir a atividade de MPO no pâncreas em 58%, 51% e 43%, no pulmão em 42%, 56% e 42% e no fígado em 51%, 66% e 56%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle ceruleína. Não houve diferença significativa entre as doses de MoCBP4 (Figura 9).

Figura 9: Lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* (MoCBP4) reduz a atividade da mieloperoxidase (MPO) no pâncreas, pulmão e fígado de camundongos com pancreatite aguda.



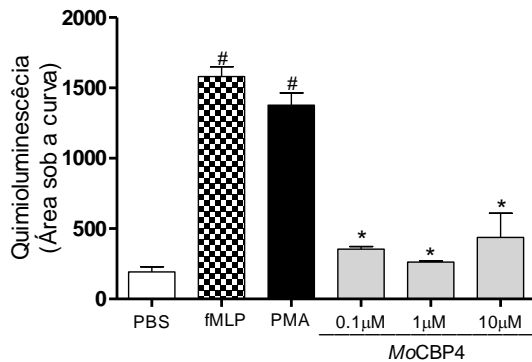
Animais foram tratados com salina (v.o.) ou MoCBP4 (20, 40 ou 80mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração da ceruleína (5 x 50µg/kg, 1/1h, i.p.). Após 6h da última administração de ceruleína, os animais foram eutanasiados e os órgãos foram coletados para análise. Resultados são expressos como a média da atividade da MPO ± E.P.M. de 6 animais por grupo. # p<0,05 indica diferença estatística comparado com grupo Salina e * p<0,05 com o grupo Ceruleína (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

6.5. Efeito da lectina MoCBP4 sobre produção de EROs por neutrófilos estimulados com fMLP e PMA:

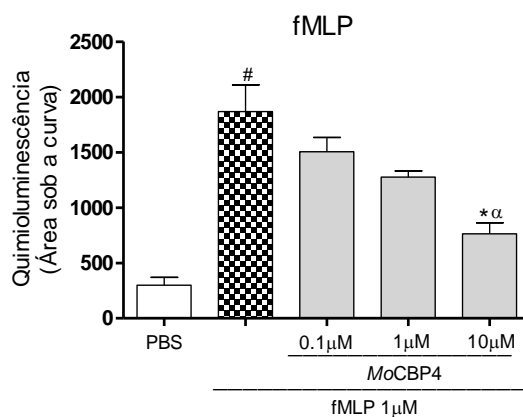
Após isolamentos dos neutrófilos a partir da medula óssea dos camundongos, estes foram estimulados com fMLP e PMA. A figura 22 A demonstra que MoCBP4 nas concentrações de 0.1 µM, 1 µM e 10µM foi incapaz de causar ativação dos neutrófilos. Apenas a maior concentração de MoCBP4 se mostrou eficaz em reduzir significativamente a ativação causado por fMLP e PMA em 59% e 58% respectivamente (Figura 10 B e C).

Figura 10: A lectina MoCBP4 reduziu a produção de EROs por neutrófilos estimulados por fMLP e PMA.

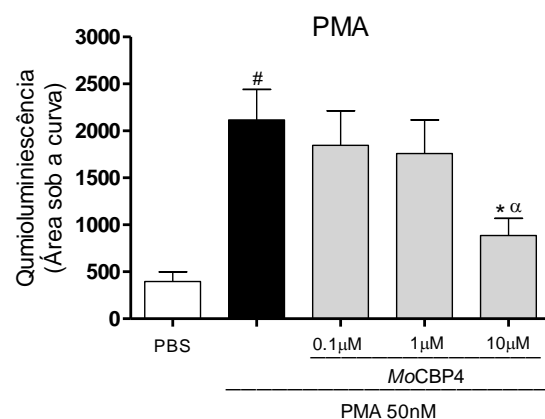
A)



A)



C)



Neutrófilos foram isolados a partir da medula óssea de camundongos saudáveis. (A) fMLP, PMA, MoCBP4 nas concentrações 0.1 μM, 1 μM e 10 μM foram adicionados isoladamente sobre cada poço contendo neutrófilos suspensos em solução tampão. As células foram pré-tratadas com solução salina e MoCBP4 (0.1 μM, 1 μM e 10 μM) e após 10 min, adicionou-se fMLP (B) e PMA (C). Logo em seguida, a placa foi colocada em leitor por 30 minutos. Valores representam a média ± E.P.M de ensaios realizados com células obtidas de 04 animais. # $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado ao grupo Salina. * $p < 0,05$ comparado aos grupos fMLP e PMA e α $p < 0,05$ comparado aos grupos MoCBP4 0.1 μM + fMLP, MoCBP4 1 μM + fMLP, MoCBP4 0.1 μM + PMA e MoCBP4 1 μM + PMA (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

6.6. Avaliação histológica dos pâncreas, pulmão e fígado:

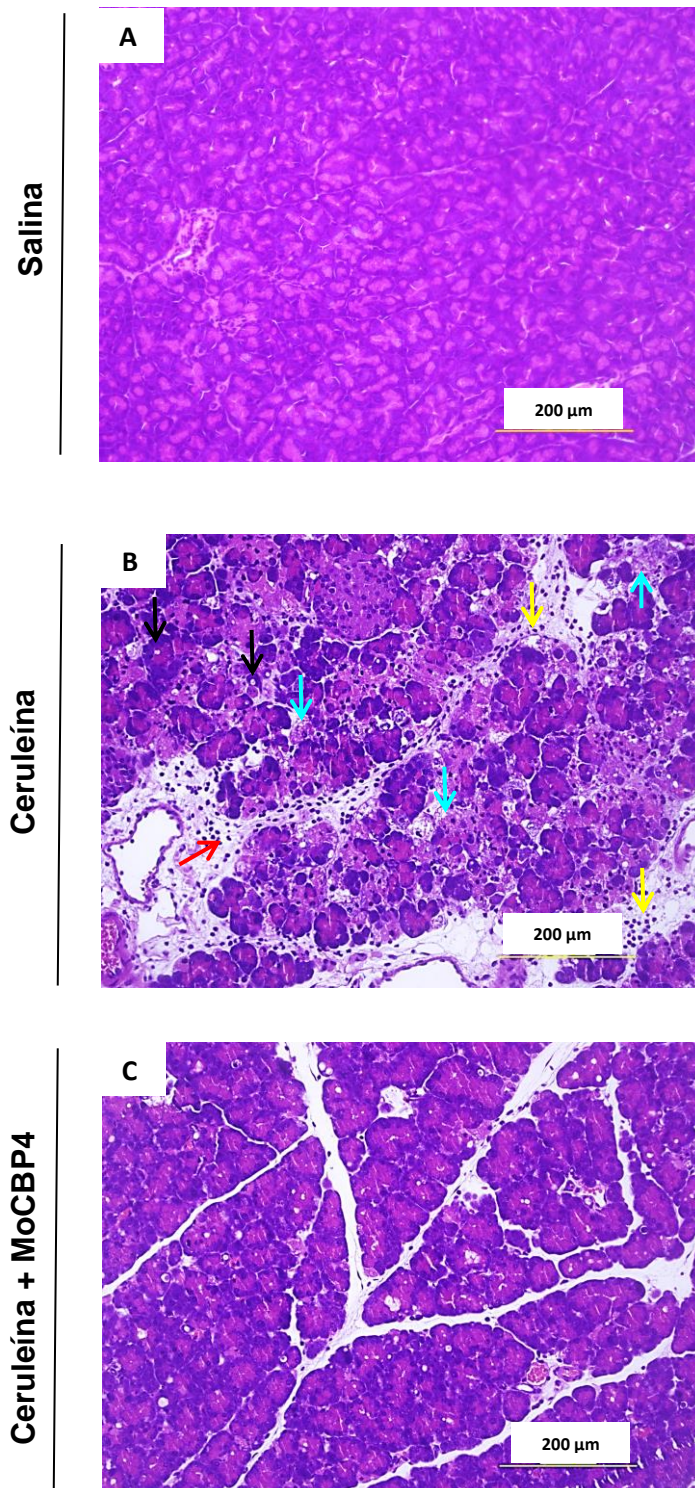
A partir dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina foram analisadas alterações morfológicas nos tecidos do pâncreas, pulmão e fígado.

No pâncreas dos animais que receberam apenas salina, os acinos e células acinares se mostraram absolutamente preservadas e com ausência de infiltrado de células inflamatórias (Figura 11 A). Por outro lado, aqueles animais tratados com ceruleína apresentaram importante desarranjo tecidual caracterizado pela presença

de edema intersticial, intenso infiltrado de PMN, áreas necróticas além de vacuolização celular (Figura 11 B). O pré-tratamento com MoCBP4 (40 mg/kg) foi capaz de reduzir o grave dano tecidual causado pela administração de ceruleína (Figura 11 C).

Em análise quantitativa (Tabela 1), foram atribuídos escores histológicos (0, 1, 2 e 3) de acordo com a intensidade de cada alteração específica que foi avaliada. A partir destes dados, observou-se que o pré-tratamento dos animais com a MoCBP4 foi eficiente em reduzir de forma significativa o edema, o infiltrado de PMN e a necrose pancreática induzidos pela ceruleína.

Figura 11: Fotomicrografias representativas do tecido pancreático de camundongos com pancreatite aguda induzida por ceruleína.



Animais foram tratados com salina ou *MoCBP4* (40 mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração da ceruleína (5 x 50 µg/kg, 1/1h, i.p.). Após 6 h da última administração de ceruleína, os animais foram eutanasiados e, em seguida, os pâncreas foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método Hematoxilina-Eosina (200x). **Painel A** representa o grupo controle salina com arquitetura tecidual preservada. **Painel B** representa o grupo controle ceruleína com arquitetura pancreática desorganizada com edema (Seta vermelha), infiltrado de polimorfonucleares (Setas amarelas), necrose (Setas azuis) e vacuolização celular (Setas pretas). **Painel C** representa o grupo Ceruleína + *MoCBP4*.

Tabela 1: Lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* (MoCBP4) preveniu alterações histológicas no pâncreas de camundongos com pancreatite aguda induzida por ceruleína.

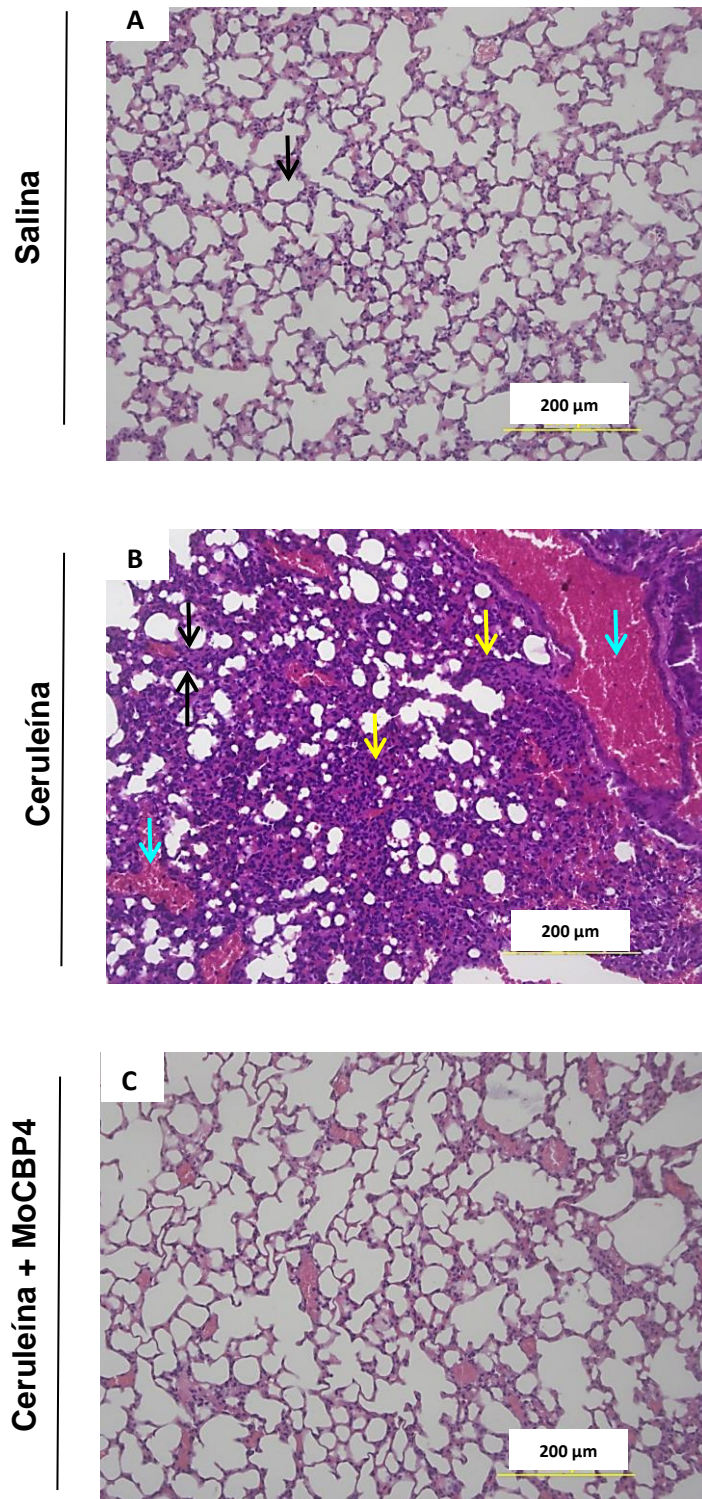
Grupos experimentais	Edema (0-3)	Infiltração de PMN (0-3)	Necrose (0-3)
Salina	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)
Ceruleína	3 (3-3) [#]	2 (2-3) [#]	3 (3-3) [#]
Ceruleína + MoCBP4	2 (1-3) [*]	1 (1-2) [*]	1 (1-2) [*]

Animais foram tratados com salina (v.o.) ou MoCBP4 (40 mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração da ceruleína (5 x 50µg/kg, 1/1h, i.p.). Após 6 h da última administração de ceruleína, os animais foram eutanasiados e, em seguida, os pâncreas foram removidos e processados para análise microscópica dos parâmetros pontuados: edema, infiltrado inflamatório e necrose. Os resultados foram expressos como mediana (mínimo e máximo) dos valores de escores atribuídos. Foram utilizados 8 animais por grupo. [#] p<0,05 quando comparado ao grupo controle salina e ^{*} p<0,05 quando comparado ao grupo controle ceruleína (Kruskal-Wallis, teste de Dunn).

As fotomicrografias do tecido pulmonar dos animais que receberam apenas salina apresentaram arquitetura tecidual totalmente preservada (Figura 12 A). Em contrapartida, os animais submetidos ao tratamento com ceruleína apresentaram considerável espessamento da parede alveolar, com intensa infiltração PMN, além de áreas hemorrágicas, condições estas que favorecem a uma insuficiência respiratória (Figura 12 B). Nos camundongos com PA pré-tratados com MoCBP4 (40 mg/kg), foi observada uma preservação da arquitetura do tecido pulmonar e discreto infiltrado de PMN (Figura 12 C).

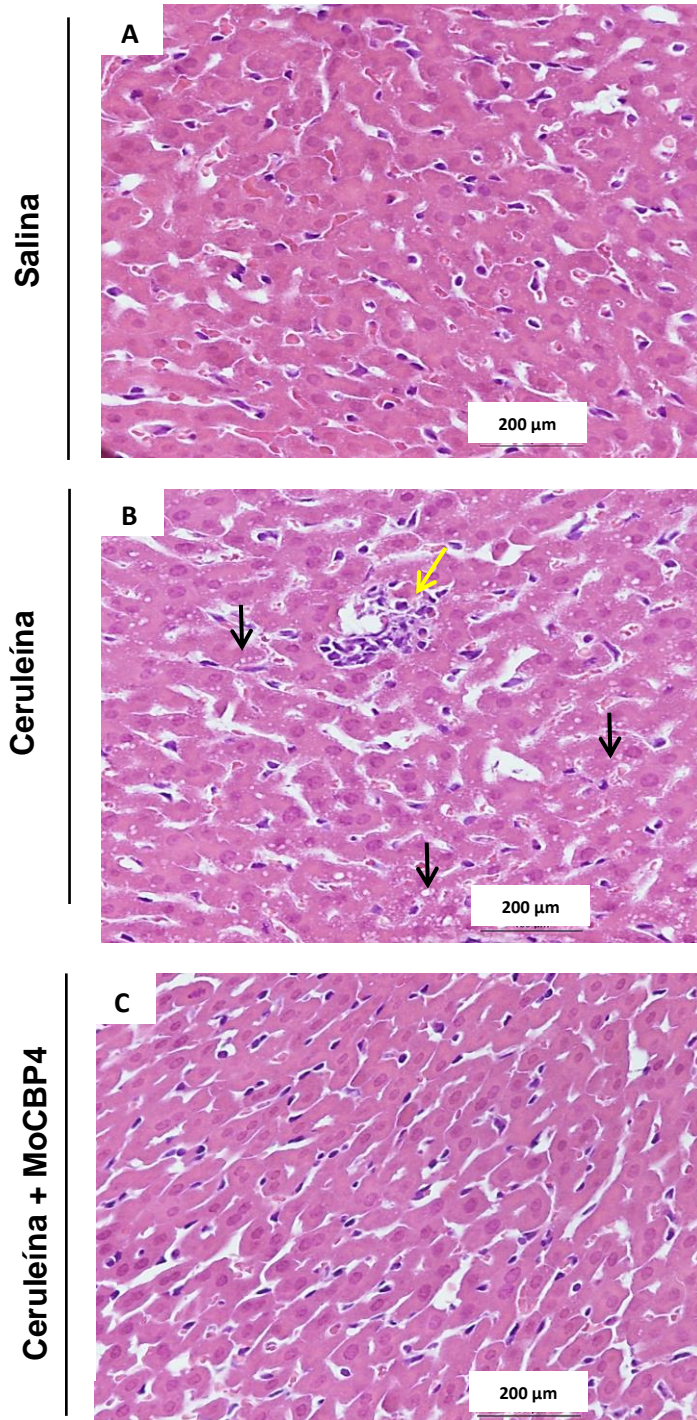
As fotomicrografias do fígado demonstram arquitetura preservada nos grupos experimentais Salina (Figura 13 A) e MoCBP4 (40 mg/kg), porém observou-se infiltrado inflamatório e discreta vacuolizações em animais do grupo Ceruleína (Figura 13 B).

Figura 12: Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos com pancreatite aguda induzida por ceruleína.



Animais foram tratados com salina (v.o.) ou MoCBP4 (40mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração da ceruleína (5 x 50µg/kg, 1/1h, i.p.). Após 6 h da última administração de ceruleína, os animais foram eutanasiados, em seguida, os pulmões foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método Hematoxilina-Eosina (200x). **Painel A** representa o grupo controle salina com arquitetura tecidual preservada. **Painel B** representa o grupo controle ceruleína com arquitetura pancreática desorganizada e consideráveis espessamentos da parede alveolar (Setas pretas), denso infiltrado inflamatório (Setas amarelas) e hemorragia (Setas azuis). **Painel C** representa o grupo Ceruleína + MoCBP4.

Figura 13: Fotomicrografias representativas do tecido hepático de camundongos com pancreatite aguda induzida por ceruleína.

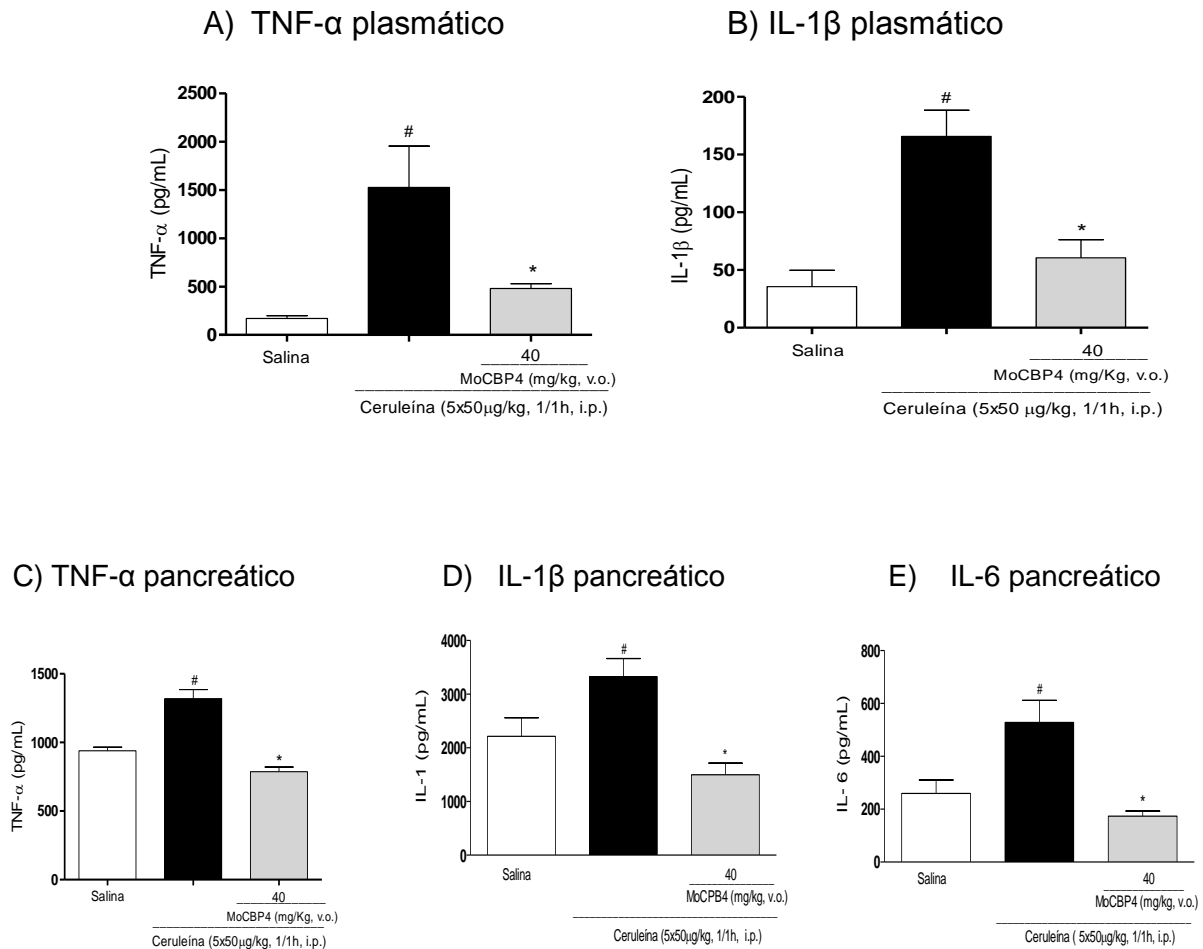


Animais foram tratados com salina (v.o.) ou MoCBP4 (40mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração da ceruleína (5 x 50µg/kg, 1/1h, i.p.). Após 6 h da última administração de ceruleína, os animais foram sacrificados, em seguida, os pulmões foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método Hematoxilina-Eosina (200x). **Painel A** representa o grupo controle salina com arquitetura tecidual preservada. **Painel B** representa o grupo controle ceruleína com presença de infiltrado de polimorfonucleares (Seta amarela) e vacuolização nos hepatócitos (Setas pretas). **Painel C** representa o grupo Ceruleína + MoCBP-4.

6.7. Efeito da lectina MoCBP4 sobre as concentrações plasmáticas e pancreáticas das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6):

Os resultados apresentados na Figura 14 demonstram que o modelo de PA induzido por ceruleína em camundongos é caracterizado também por mudanças no perfil de citocinas inflamatórias no sangue e pâncreas dos animais. No grupo controle Ceruleína, observou-se um aumento significativo dos níveis plasmáticos de TNF- α e IL-1 β e dos níveis pancreáticos de TNF- α , IL-1 β e IL-6, quando comparados ao grupo controle Salina. Em contrapartida, o pré-tratamento dos animais com MoCBP4 (40 mg/kg) foi eficiente em reverter de forma significativa o aumento das citocinas pró-inflamatórias provocado pela administração de ceruleína. A lectina reduziu de forma significativa as concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-1 β em 68% e 63%, respectivamente (Figura 14 A e B), e no pâncreas, em 40%, 55% e 67% nos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6, respectivamente, quando comparados ao grupo controle Ceruleína (Figura 14 C, D e E).

Figura 14: Lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* (MoCBP4) reduz as concentrações plasmáticas e pancreáticas das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) em camundongos com pancreatite aguda.



Animais foram tratados com salina (v.o.) ou MoCBP4 (40 mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração da celuleína (5 x 50 μ g/kg, 1/1h, i.p.). Após 6 h da última administração de ceruleína, os animais foram eutanasiados, em seguida, o soro e pâncreas foram coletados para análises. Resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais por grupo. # $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com grupo Salina e * $p < 0,05$ com o grupo Ceruleína. (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

6.8. Efeito da lectina MoCBP4 sobre marcadores do estresse oxidativo no pâncreas

a) Grupos sulfidrílicos não-proteicos (NP-SH)

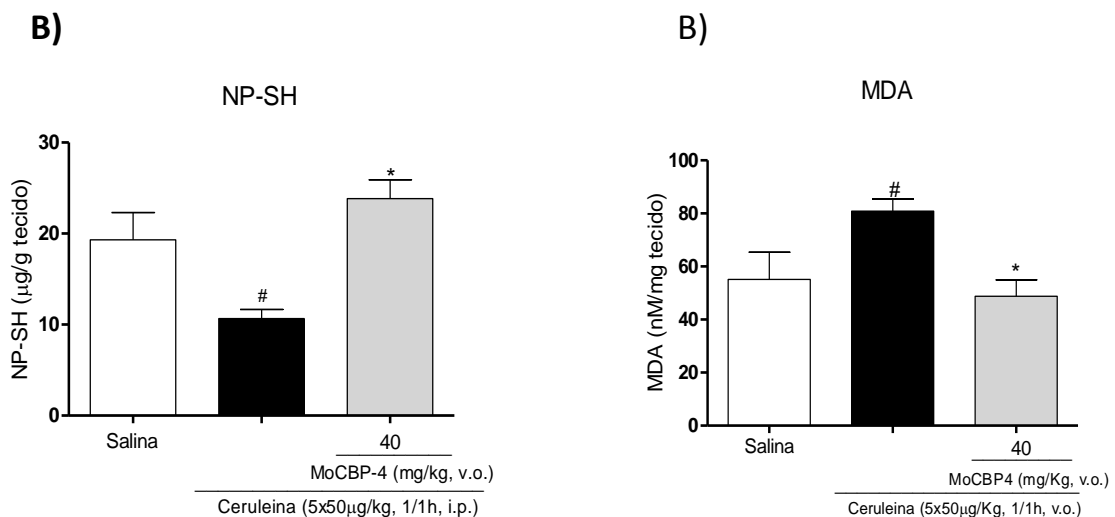
O grupo controle ceruleína demonstrou níveis significativamente reduzidos de NP-SH quando comparado ao grupo controle salina. O pré-tratamento com MoCBP4

na dose de 40 mg/kg foi hábil em recuperar completamente os níveis pancreáticos deste mediador podendo ser observado concentrações semelhantes ao grupo Salina (Figura 15 A).

b) Malonaldeído (MDA)

Os animais tratados apenas com ceruleína apresentaram níveis significativamente elevados de MDA no pâncreas, entretanto este aumento foi prevenido pelo tratamento prévio dos animais com MoCBP4 (40 mg/kg) (Figura 15 B).

Figura 15: Lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* (MoCBP4) aumenta concentração de NP-SH e reduz níveis de MDA no pâncreas de camundongos com pancreatite aguda.

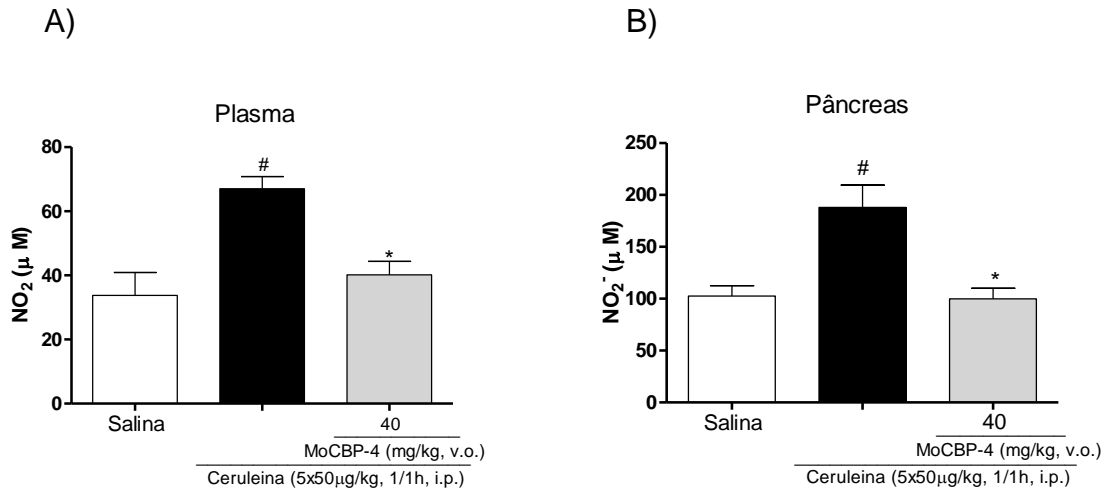


Animais foram tratados com salina (v.o.) ou MoCBP4 (40mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração da celuleína (5 x 50µg/kg, 1/1h, i.p.). Após 6 h da última administração de ceruleína, os animais foram sacrificados, em seguida, o pâncreas foi coletado para análises. Resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 8 animais por grupo. # p<0,05 indica diferença significativa comparado com grupo Salina e * p<0,05 com o grupo Ceruleína. (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

6.9. Efeito da lectina MoCBP4 sobre óxido nítrico plasmático e pancreático

O grupo controle ceruleína demonstrou níveis significativamente aumentados de NO₂⁻ quando comparado ao grupo Salina. O pré-tratamento com MoCBP4 na dose de 40 mg/kg preveniu o aumento de nitrito provocado por ceruleína tanto no plasma (Figura 16 A) como no pâncreas (Figura 16 B).

Figura 16: Lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* (MoCBP4) reduz níveis de nitrito plasmático e pancreáticos em camundongos com pancreatite aguda.

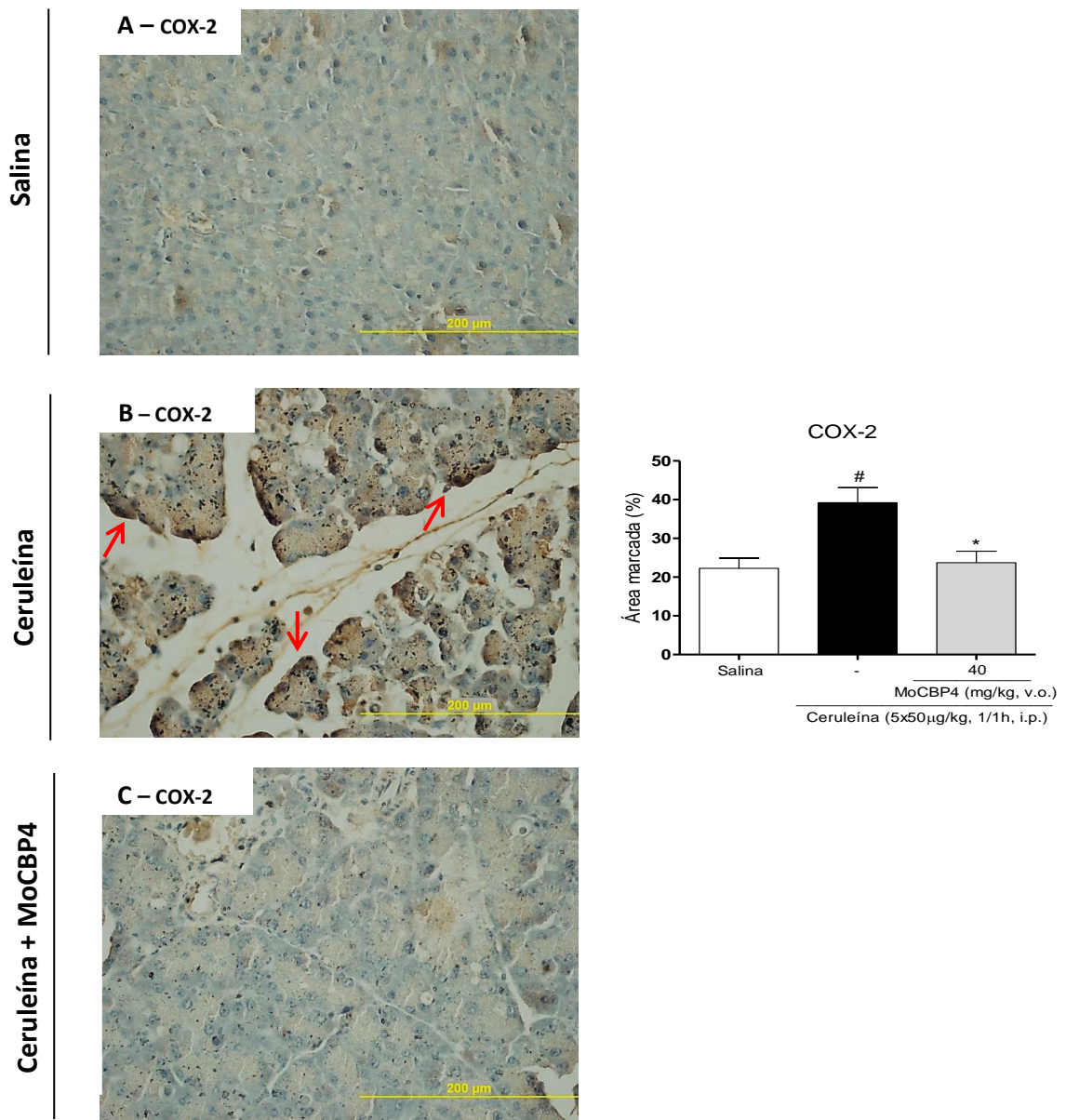


Animais foram tratados com salina (v.o.) ou MoCBP4 (40mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração da ceruleína (5 x 50μg/kg, 1/1h, i.p.). Após 6 h da última administração de ceruleína, os animais foram eutanasiados, em seguida, o pâncreas foi coletado para análises. Resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 8 animais por grupo. # p<0,05 indica diferença significativa comparado com grupo Salina e * p<0,05 com o grupo Ceruleína. (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

6.10. Efeito da lectina MoCBP4 sobre a imunomarcação de COX-2 e TNFα no pâncreas

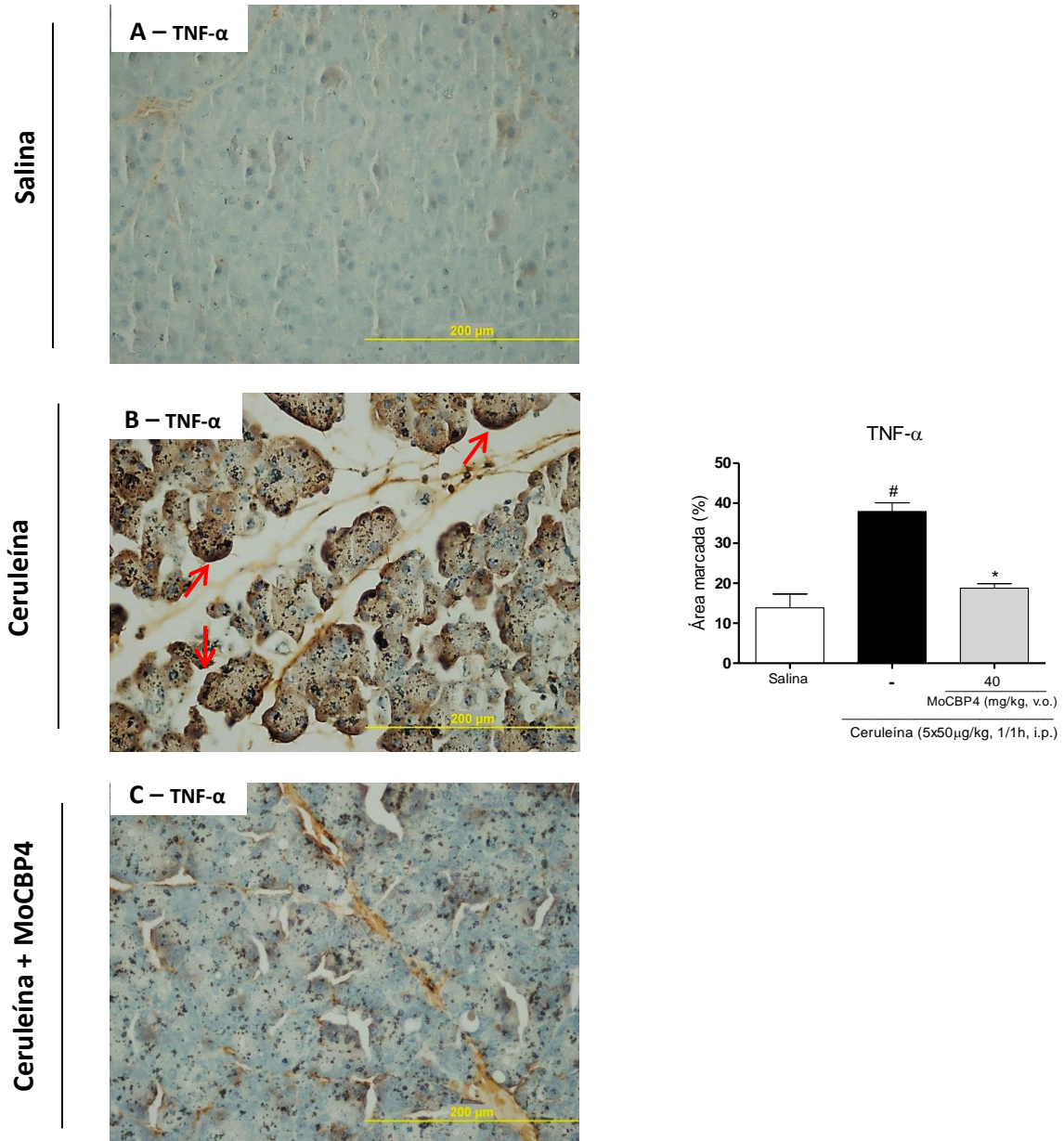
As figuras 17 e 18 demonstram, respectivamente, a imunocoloração para COX-2 e TNFα no pâncreas de camundongos que receberam tratamentos distintos. No grupo Salina, tanto para COX-2 como para TNFα, foi observado leve marcação. Por outro lado, no grupo Ceruleína foi verificada uma marcação mais intensa quando comparada ao grupo Salina. Já nos animais tratados com MoCBP4 (40 mg/kg), a intensidade da imunomarcação observada foi bem menor quando comparada ao grupo Ceruleína. A MoCBP4 (40 mg/kg) foi capaz de reduzir a imunomarcação da COX-2 e TNF-α em 39,5% e 50,6%, respectivamente, quando comparadas ao grupo Ceruleína.

Figura 17: Lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* (MoCBP4) reduziu a imunomarcção de COX-2 no pâncreas de camundongos com pancreatite aguda.



Animais foram tratados com salina (v.o.) ou MoCBP4 (40mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração da ceruleína (5 x 50µg/kg, 1/1h, i.p.). Após 6 h da última administração de ceruleína, os animais foram eutanasiados, em seguida, o pâncreas foi coletado e processado para a técnica imunohistoquímica (200x). **Painel A** representa o grupo Salina com imunomarcção basal do pâncreas. **Painel B** representa o grupo Ceruleína com considerável imunomarcção para COX-2. **Painel C** representa o grupo Ceruleína + MoCBP4 com imunomarcção semelhante ao grupo Salina. Resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 3 animais por grupos. # $p < 0,05$ indica diferença significativa comparado com grupo Salina e * $p < 0,05$ com o grupo Ceruleína. (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

Figura 18: Lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* (MoCBP4) reduziu a imunomarcagem de TNF α no pâncreas de camundongos com pancreatite aguda.



Animais foram tratados com salina (v.o.) ou MoCBP4 (40mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração da celuleína (5 x 50 μ g/kg, 1/1h, i.p.). Após 6 h da última administração de ceruleína, os animais foram eutanasiados e, em seguida, o pâncreas foi coletado e processado para a técnica imunohistoquímica (200x). **Painel A** representa o grupo Salina com imunomarcagem basal do pâncreas. **Painel B** representa o grupo Ceruleína com considerável imunomarcagem para TNF α . **Painel C** representa o grupo Ceruleína + MoCBP4 com imunomarcagem semelhante ao grupo Salina. Resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupos. # $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com grupo Salina e * $p < 0,05$ com o grupo Ceruleína. (ANOVA, teste de Newman-Keuls Multiple Comparison).

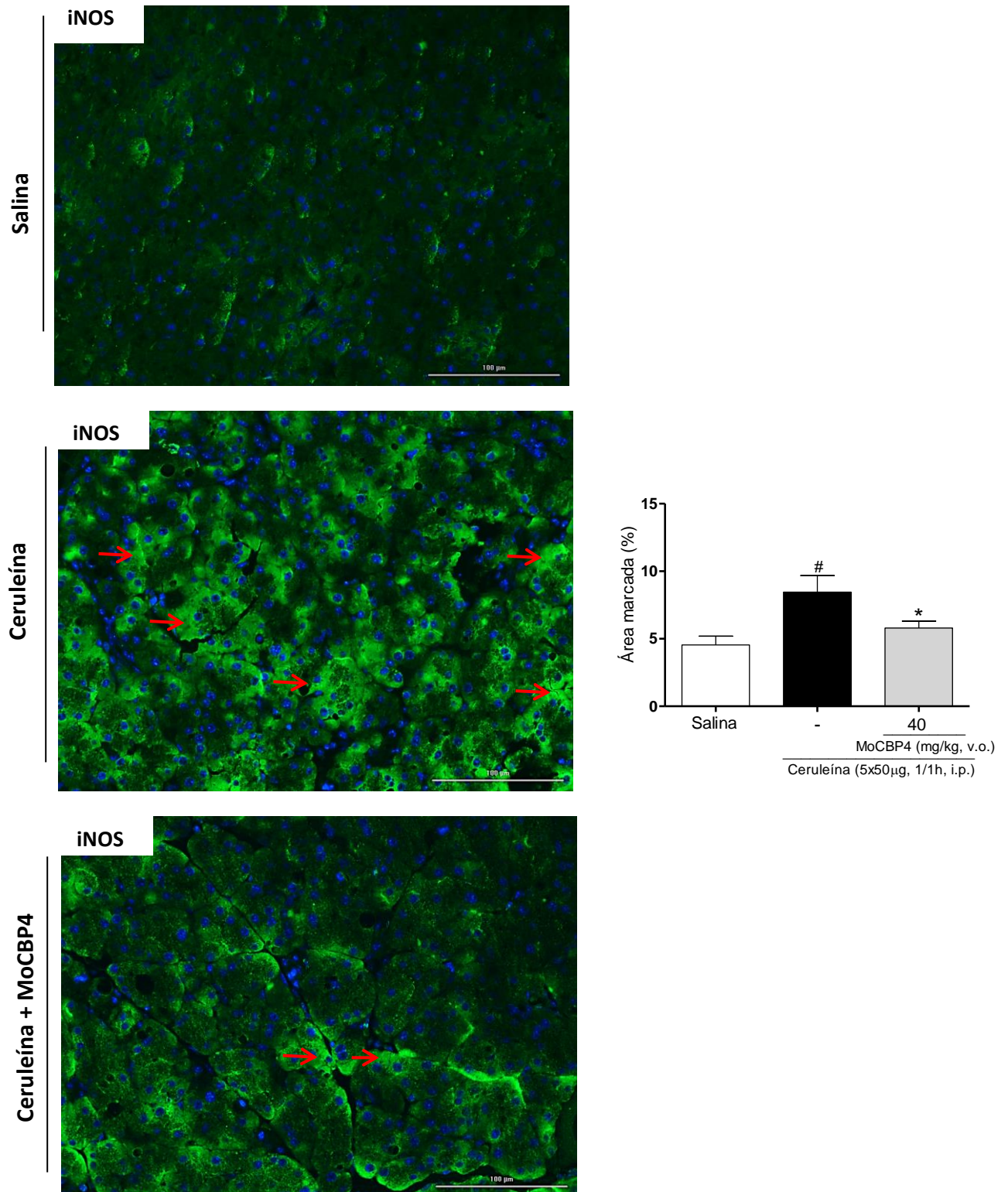
6.11. Efeito da lectina MoCBP4 sobre a imunomarcacão de iNOS e NF- κ B no pâncreas

A figura 19 demonstra a imunofluorescência citoplasmática da enzima iNOS no pâncreas. O grupo Ceruleína apresentou maior imunofluorescência citoplasmática da iNOS (marcação com AlexaFluor 488 – cor verde) quando comparado ao grupo Salina. Por outro lado, o grupo MoCBP4 (40 mg/kg) reduziu a imunofluorescência citoplasmática da iNOS em 31,5% quando comparado ao grupo Ceruleína.

A figura 20 demonstra que o grupo Ceruleína apresenta maior número de núcleos marcados com AlexaFluor 488 (setas vermelhas), o que indica aumento da translocação do NF- κ B para o núcleo e, conseqüentemente, maior ativação deste fator de transcrição. No grupo Salina esta marcação nuclear não é observada (círculos vermelhos). Nos animais com pancreatite aguda tratados com MoCBP4 (40 mg/kg), a marcação nuclear é menos evidente quando se compara ao grupo Ceruleína, inferindo uma redução da ativação do NF- κ B.

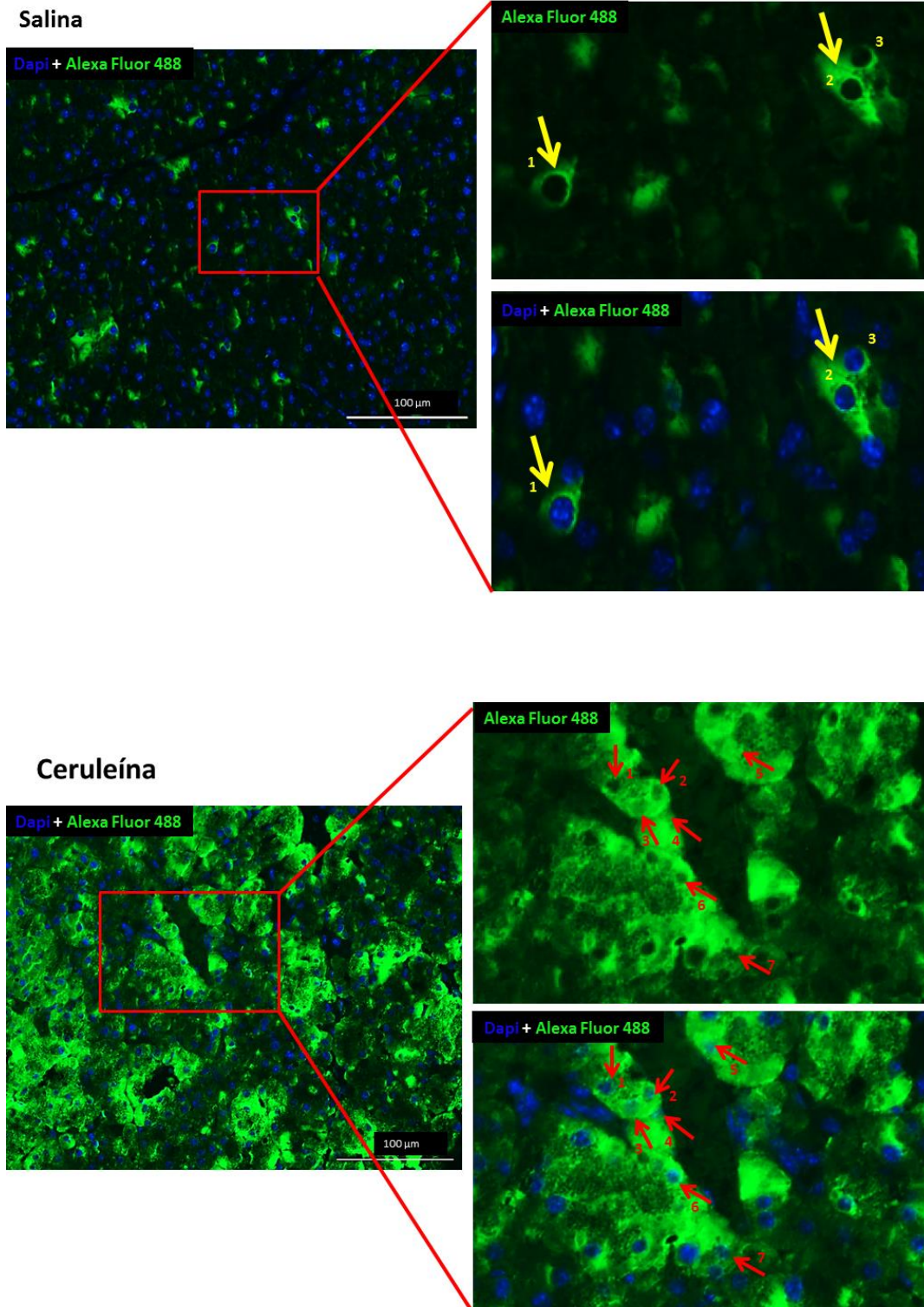
Figura 19: Lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* (MoCBP4) reduziu a imunofluorescência de iNOS no pâncreas de camundongos com pancreatite aguda.

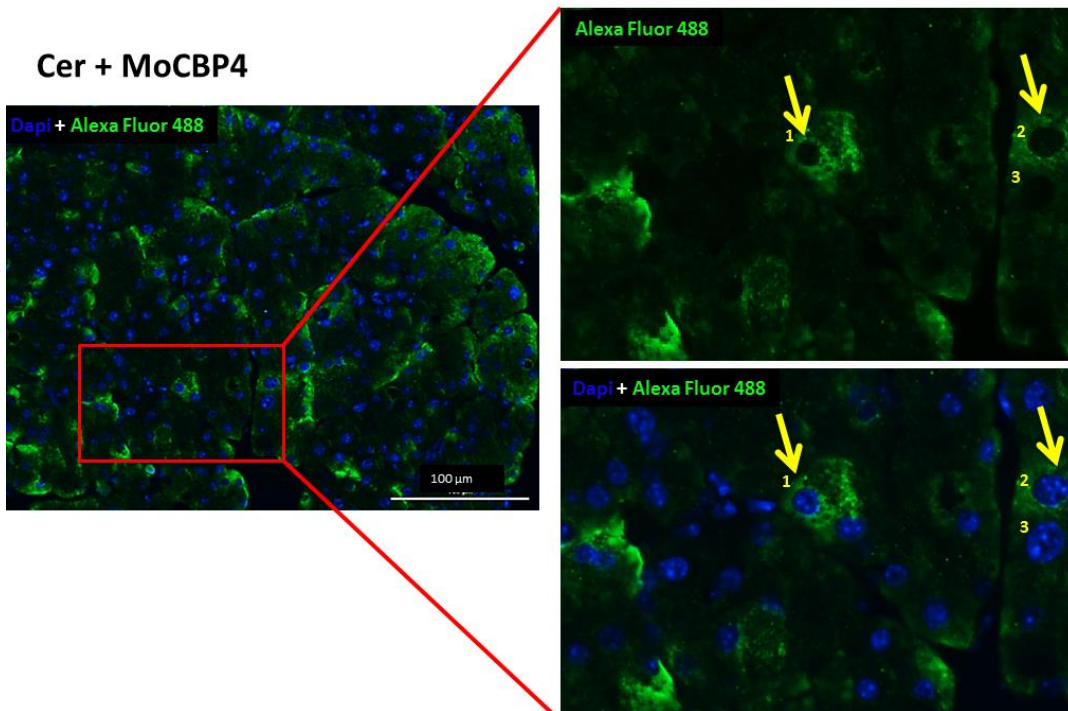
AlexaFluor 488 + Dapi



Animais foram tratados com MoCBP4 (40mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração da ceruleína (5 x 50µg/kg, 1/1h, i.p.). Após 6 h da última administração de ceruleína, os animais foram eutanasiados e, em seguida, o pâncreas foi coletado e processado para a técnica imunofluorescência (200x). Resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 3 animais por grupo. # p<0,05 indica diferença estatística comparado com grupo Salina e * p<0,05 com o grupo Ceruleína (ANOVA, teste de Newma-Keuls).

Figura 20: Lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* (MoCBP4) reduziu a imunofluorescência de NF- κ B no núcleo das células acinares do pâncreas de camundongos com pancreatite aguda.



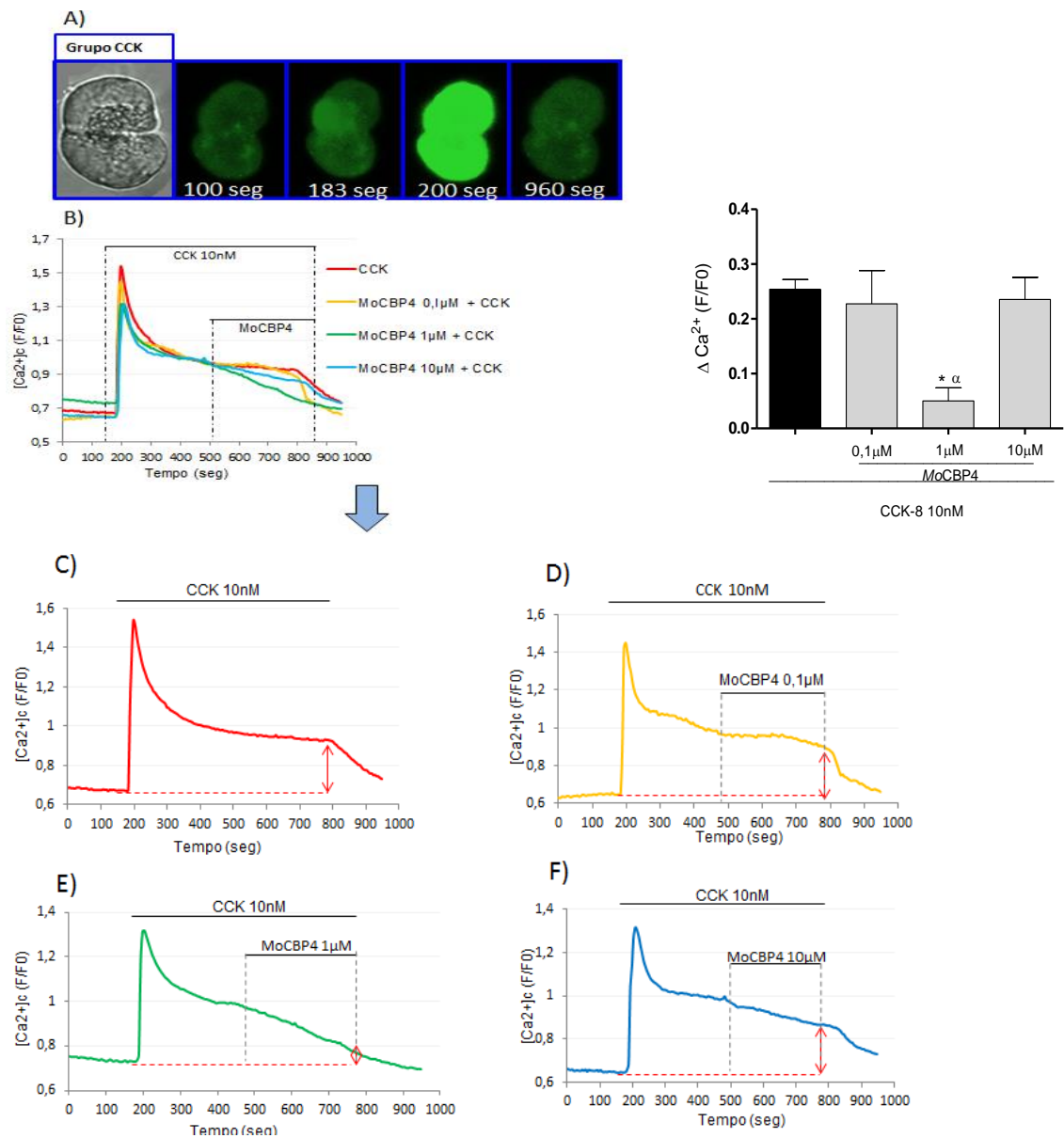


Animais foram tratados com MoCBP4 (40 mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração da ceruleína (5 x 50 µg/kg, 1/1 h, i.p.). Após 6 h da última administração de ceruleína, os animais foram eutanasiados e, em seguida, o pâncreas foi coletado e processado para a técnica imunofluorescência (200x). Setas amarelas indicam núcleos das células acinares não marcados por NF-κB (sem marcação com AlexaFluor 488). Setas vermelhas indicam translocação nuclear do NF-κB (núcleo marcados com AlexaFluor 488).

6.12. Efeito da lectina MoCBP4 sobre a concentração do íon cálcio citosólico em células acinares isoladas:

Após isolamento das células acinares pancreáticas, estas foram estimuladas com colecistocinina-8 (CCK). A figura 21 A mostra o pico característico que representa o aumento da concentração do íon cálcio citosólico ($[Ca^{2+}]_c$) imediatamente após adição de CCK sobre as células (a partir do tempo: 180s). O aumento sustentado do Ca^{2+} (platô) foi observado nas células submetidas apenas à CCK (linha contínua vermelha, figura 21 B e C). Ao adicionar a solução MoCBP4 + CCK sobre as células (a partir do tempo 480s), observou-se uma redução da concentração Ca^{2+} citosólico, ou seja, houve diminuição do platô quando foi adicionada a lectina nas concentrações de 1 µM (linha verde, figura 21 B e E) e 10 µM (linha azul, figura 21 B e F), entretanto apenas a concentração 1µM demonstrou redução significativa de 80% quando comparada ao grupo CCK (Figura 21 B). Toda a corrida, 0 segundos a 960 segundos, ocorreu em meio Heppes $CaCl_2$ 5 mM.

Figura 21: Efeito MoCBP4 sobre a concentração do íon cálcio citosólico ($[Ca^{2+}]_c$) em células acinares isoladas estimuladas por colecistocinina-8 (CCK).

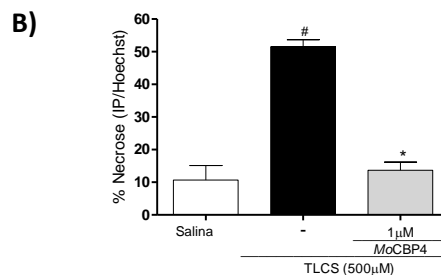
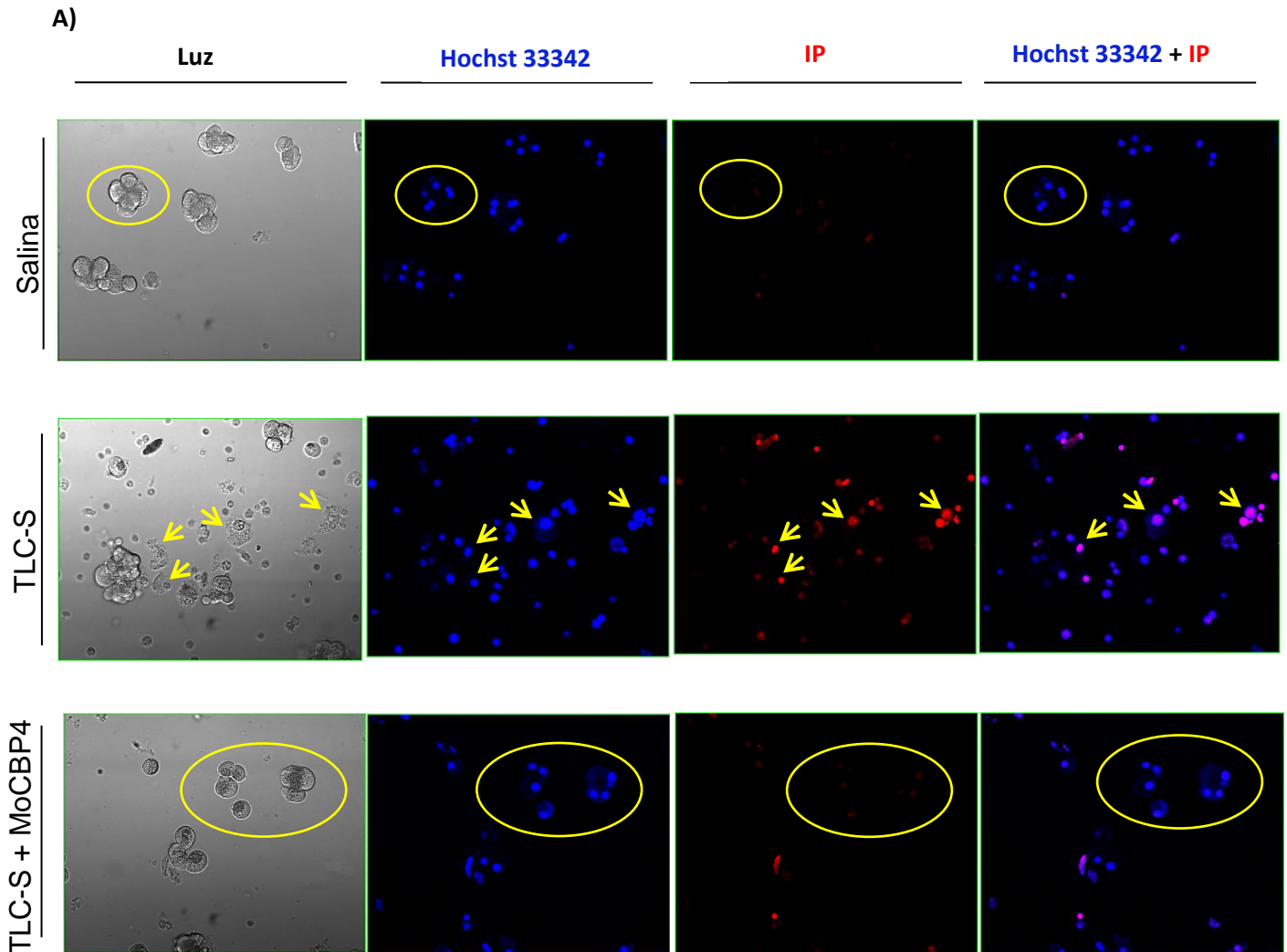


Aplicação de CCK 10 nM (180 a 780 segundos) induziu aumento da $[Ca^{2+}]_c$ seguido de um platô sustentado sobre a linha basal (linha vermelha, B e C). MoCBP4 + CCK foram aplicadas (480 a 780 segundos). MoCBP4 0,1 µM + CCK (linha amarela, B e D); MoCBP4 1µM + CCK (linha verde, B e E) e MoCBP4 10µM + CCK (linha azul B e F). Setas vermelhas indicam a redução do platô (tempo 780 segundos, B, C, D e E). F0 representa a fluorescência em determinado intervalo de tempo (380 a 480 segundos) e F representa a fluorescência registrada a cada tempo no decorrer da leitura. O delta foi calculado a partir da diferença entre a fluorescência registrada no tempo 170s e 780s. Valores representam a média \pm E.P.M de 76 células. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com grupo CCK e α $p < 0,05$ comparado com grupos MoCBP4 100 nM + CCK e MoCBP4 10 µM + CCK (ANOVA, teste de Newman-Keuls).

6.13. Efeito da lectina MoCBP4 sobre a necrose induzida por TLC-S em células acinares pancreáticas:

A figura 22 A demonstra as células em necrose (setas em amarelo) e as células íntegras (círculos em amarelo). A MoCBP4 na concentração 1 μ M foi capaz de reduzir significativamente a necrose induzida por TLC-S em 73% quando comparada ao grupo de células tratadas apenas com TLC-S (Figura 22 B).

Figura 22: Lectina isolada das sementes de *Moringa oleífera* (MoCBP4) reduz necrose induzida por TLC-S em células acinares pancreáticas de camundongos.



As células acinares foram isoladas a partir do pâncreas de camundongos saudáveis. Estas células foram inicialmente incubadas (60 minutos) com MoCBP4 na concentração 1 µM. Seguiram-se com as adições de TLC-S (incubação por 30 minutos) e Hochst 33342 e Iodeto de Propídio - IP (incubação por 5 minutos). A cada grupo experimental foram registradas 10 imagens em campos diferentes e a necrose foi quantificada (%) através da razão entre o número de células (marcadas com Hochst 33342) totais e o número de células em necrose (marcada com IP). Círculos em amarelo indicam células íntegras. Setas em amarelo indicam células em necrose. Valores representam a média ± E.P.M de ensaios realizados com células de 03 animais. Número total de células contabilizadas: 2373. # p<0,05 indica diferença estatística comparado ao grupo Salina. * p<0,05 comparado ao grupo TLC-S (ANOVA, teste de Newman-Keuls Multiple Comparison).

7. Discussão

Este estudo foi realizado com o intuito de investigar o efeito de uma proteína purificada a partir das sementes de *Moringa oleifera*, nomeada MoCBP4, em modelo clássico de pancreatite aguda induzida por ceruleína em camundongos. Para tanto, mediadores inflamatórios e mecanismos celulares específicos intimamente relacionados à patogênese da pancreatite foram avaliados, para só então ser proposto um possível mecanismo de ação para MoCBP4.

O modelo experimental de pancreatite aguda induzida por ceruleína, um análogo à colecistocinina, foi escolhido por ser capaz de mimetizar os estágios iniciais da pancreatite aguda em humanos. A ceruleína se liga aos receptores de colecistocinina (CCK 1 e CCK 2) presentes nas membranas das células acinares e, quando administrada em doses supra máximas, causa aumento sustentado do íon cálcio citoplasmático, o que promove ativação prematura de enzimas proteolíticas com subsequente autodigestão pancreática (CHAN & LEUNG, 2007; SALUJA *et al.*, 1997; KAUFMANN; ROSSLER; THIEL, 2014).

Faz-se necessário ressaltar que, em consonância com estudos prévios (LIMA *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2011), neste trabalho a administração de cinco injeções de ceruleína (50µg/kg) por via intraperitoneal foi capaz de induzir a pancreatite aguda em camundongos, evidenciada pelo aumento significativo do edema pancreático, das enzimas plasmáticas lipase e amilase, incremento da atividade da mieloperoxidase no pâncreas e das citocinas inflamatórias, bem como aumento da peroxidação lipídica e da necrose pancreática.

Apesar de terem baixa correlação com a gravidade da doença, as atividades plasmáticas de amilase e lipase são os principais exames laboratoriais utilizados para o diagnóstico da pancreatite aguda em humanos (YADAV, AGARWAL, PITCHUMONI, 2002). A hiperamilasemia apresenta alta sensibilidade e aumenta nas primeiras horas após o desenvolvimento da dor (FAN; ANDRÉN-SANDBERG, 2010). Entretanto, é a dosagem da lipase sérica que é considerada o exame laboratorial primário para o diagnóstico, já que apresenta alta sensibilidade e especificidade, além de se manter elevada por vários dias após início da inflamação, superando assim a dosagem da amilase como exame de diagnóstico (KOLAR *et al.*, 1984).

O pré-tratamento por via oral com MoCBP4 nas doses de 20, 40 e 80 mg/kg reduziu as atividades plasmáticas da amilase e lipase dos animais com pancreatite aguda. Este dado indica efeito protetor desta lectina sobre o pâncreas, visto que estas enzimas participam do processo autodigestivo característico da lesão pancreática na pancreatite aguda (BATHIA, 2005).

Em estudo realizado por Jonas e col. (1998) foi demonstrado que uma lectina da mesma classe da MoCBP4, lectinas ligantes à quitina, nomeada WGA, reduziu em 40% a atividade plasmática da amilase em modelo de pancreatite induzida por ceruleína em ratos. Entretanto, diferentemente do presente trabalho, em que MoCBP4 foi administrada apenas uma vez e por via oral, a WGA foi administrada em conjunto com a ceruleína por cinco vezes e por via intraperitoneal. Outros estudos comprovam que a WGA se liga aos receptores CCK e inibe, em até 70%, a ligação da colecistocinina a estes receptores. Por esta razão, a WGA é capaz de reduzir a hiper-estimulação das células acinares e, conseqüentemente, diminuir os níveis amilase. Tal efeito é abolido quando WGA esta ligada ao seu açúcar específico N-acetilglucosamina, comprovando a importante relação entre o sítio de ligação a carboidrato presente nas lectinas e os efeitos biológicos destas (DAMM *et al.*, 2004; MIKKAT *et al.*, 1998, 2001).

Levando-se em consideração que ambas as lectinas MoCBP4 e WGA apresentam resíduos de aminoácidos semelhantes em suas estruturas químicas e se ligam especificamente ao mesmo açúcar, N-acetil-D-glucosamina, não pode ser descartada a possibilidade da MoCBP4 ter afinidade por receptores CCK semelhante à atividade da WGA. Entretanto, devem ser realizados experimentos que investiguem minuciosamente e comprovem esta possível interação com os receptores CCK.

Os níveis plasmáticos elevados das enzimas hepáticas AST e ALT são vistos também como marcadores da pancreatite aguda (TASIC *et al.*, 2014). O aumento das atividades da AST e ALT no soro ocorre devido ao extravasamento destas enzimas em grande parte do citosol hepático para a corrente sanguínea (EL-DEMERDASH *et al.*, 2005), o que indica função desregulada deste órgão.

Estudos anteriores demonstraram que o tratamento com ceruleína, na mesma dose e via de administração utilizadas neste trabalho, provocou dano hepático em ratos com envolvimento de espécies reativas de oxigênio (MUKADDES *et al.*, 2006; BAKIR *et al.*, 2015). O tecido hepático apresenta alto consumo de oxigênio e

modestas defesas antioxidantes, sendo um órgão bastante suscetível ao estresse oxidativo, processo comum na pancreatite. Como consequência do aumento das espécies reativas de oxigênio, os distúrbios microcirculatórios no fígado e as alterações nas estruturas e funções das células hepáticas são observados (SHIBA *et al.*, 2014). Por esta razão, investigou-se o possível efeito da MoCBP4 sobre a função hepática, tendo sido observado que o tratamento com esta lectina, nas doses de 20, 40 e 80 mg/kg, foi eficiente em reduzir a atividade das enzimas ALT e AST, o que nos sugere efeito hepático protetor frente à pancreatite aguda desencadeada pelas múltiplas administrações da ceruleína.

Em concordância com os dados do presente estudo, Hamza (2010) demonstrou o efeito hepatoprotetor do extrato alcoólico de sementes de *M. oleifera* em modelo crônico de fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) em ratos. O tratamento por via oral com este extrato foi capaz de reduzir as atividades plasmáticas de ALT e AST, além de atenuar a atividade de MPO e peroxidação lipídica no fígado.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima microbicida presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, sendo amplamente utilizada como um marcador bioquímico da presença de neutrófilos no tecido inflamado (BOS *et al.*, 1978; BRADLEY *et al.*, 1982). Os neutrófilos representam um componente central na resposta imuno-inflamatória, pois atuam nos mecanismos de fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativação de mediadores inflamatórios, fazendo-se assim crucial para uma resposta resolutiva do hospedeiro contra infecções por microorganismos (MALECH & GALLIN, 1987; REAVES *et al.*, 2005). Embora tenham esse papel fundamental, a exacerbada atividade destas células leva a um processo inflamatório patológico com consequências deletérias (JONES *et al.*, 1991).

Diversos estudos têm relatado que a atividade aumentada da MPO está associada ao desenvolvimento da pancreatite aguda induzida por ceruleína, taurocolato de sódio e L-arginina em camundongos e ratos (XIAO *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2014; SEYHUN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2012). Reforçando estes estudos, outros autores comprovaram que a depleção de neutrófilos, induzida pelo pré-tratamento de camundongos com soro anti-neutrófilo, reduz a gravidade da pancreatite e previne a lesão pulmonar associada à pancreatite (BATHIA *et al.*, 1998; PASTOR *et al.*, 2003).

O rolamento dos neutrófilos mediado pelas selectinas constitui evento chave no processo de extravasamento destas células em diversas patologias inflamatórias (BAO *et al.*, 2009; NEVES *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2012), dentre elas a pancreatite aguda, estando a expressão de P-selectina aumentada em modelos experimentais de PA induzida por ceruleína (ABDULLA *et al.*, 2012). A fucoidina é um polímero que possui alta similaridade com os ligantes endógenos das selectinas e tem sido amplamente utilizada como inibidor de selectina *in vivo* em diversos estudos (ZHANG *et al.*, 2001; BENLIER *et al.*, 2011; TANAKA *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2012), inclusive apresentou efeito considerável em dois modelos experimentais de pancreatite aguda grave ao reduzir significativamente parâmetros inflamatórios locais e sistêmicos, tais como MPO, citocinas e estresse oxidativo (CARVALHO *et al.*, 2014). Ademais, Hartman e col. (2012) utilizaram anticorpo anti-P-selectina e demonstraram que este bloqueio reduziu a necrose e a hemorragia no pâncreas, bem como os níveis séricos de tripsinogênio.

Neste trabalho foi demonstrado que MoCBP4 nas doses 20, 40 e 80 kg/mg foi capaz de reduzir a atividade de MPO não somente no pâncreas, mas também no pulmão e no fígado, sugerindo efeito tanto sobre o processo inflamatório local, como também sobre o processo sistêmico característico da pancreatite aguda induzida por ceruleína. Este dado foi reforçado neste estudo através da análise histológica, em que comprovou a redução do infiltrado de células inflamatórias nos tecidos pancreático, pulmonar e hepático.

Em concordância com os dados deste trabalho, estudo anterior demonstrou que a administração oral de MoCBP4 reduziu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos tratados com zymosan, além de ter diminuído a atividade de MPO em patas injetadas com carragenina, sendo estes efeitos abolidos quando MoCBP4 foi incubada previamente com seu açúcar específico, N-acetil-D-glucosamina (PEREIRA, 2014).

Faz-se necessário ressaltar que outras lectinas vegetais compartilham deste semelhante mecanismo anti-inflamatório. Foi demonstrado, por microscopia intravital, que as lectinas de *Canavalia grandiflora*, *Lutzelburgia auriculata*, *Bauhinia bauhinioides* e *Lonchocarpus araripeensis* atenuaram o rolamento e adesão dos neutrófilos sobre endotélio, sendo este efeito dependente do domínio lectínico, uma vez que a administração concomitante com os seus respectivos açúcares específicos reverteu tal efeito (NUNES *et al.*, 2009; ALENCAR *et al.*, 2010; GIRÃO *et*

al., 2015; PIRES *et al.*, 2016). A adesão ao endotélio, mediada por selectinas, é um pré-requisito para a infiltração dos neutrófilos ao local da inflamação. Os autores destes estudos propuseram que os domínios lectínicos destas proteínas vegetais reconhecem de forma específica as moléculas de adesão e provavelmente as bloqueiam com subsequente redução da interação neutrófilo-selectina, resultando em menor transmigração destas células para o foco inflamatório. Assim, não se pode descartar que o domínio lectínico da MoCBP4 possa eventualmente bloquear as moléculas de adesão endógenas e desta forma reduzir a adesão e rolamento dos neutrófilos sobre o endotélio.

Durante a lesão inflamatória, o acúmulo de células inflamatórias na microcirculação pancreática é acompanhado por alteração da permeabilidade vascular, resultando em uma desordem microcirculatória caracterizada por vasodilatação e edema (TAKÁCS *et al.*, 2002). Em concordância, os resultados deste trabalho evidenciaram um índice de edema pancreático elevado nos animais com pancreatite aguda e aqueles pré-tratados com MoCBP4 apresentaram menor edema pancreático. Este dado foi confirmado pela análise histológica do pâncreas. Corroborando este dado, estudo prévio comprovou atividade da MoCBP4 em diminuir, de maneira dose dependente, a permeabilidade vascular induzida por ácido acético. Este efeito foi correlacionado com a redução da migração de neutrófilos induzida pelo mesmo agente flogístico (PEREIRA, 2011). Em concordância com os efeitos da MoCBP4, outras lectinas vegetais, quando administradas por via sistêmica, apresentaram atividade anti-edematogênica dependente da redução da migração de neutrófilos (PIRES *et al.*, 2016; ALENCAR *et al.*, 2010; BITENCOURT *et al.*, 2008).

Com o intuito de avançar nas investigações sobre uma possível atividade da MoCBP4 sobre os neutrófilos, foram realizados experimentos *in vitro* com estas células isoladas, as quais foram estimuladas por fMLP e PMA. O peptídeo formilado (fMLP) é utilizado como agente quimiotáxico clássico que, após ligação ao seu receptor presente nos neutrófilos, ativa a fosfolipase C (PLC), com posterior produção de IP₃ e a diacilglicerol (DAG). O IP₃ ativa canais de Ca²⁺ com liberação deste íon para o citosol e o DAG ativa a proteína quinase C (PKC). O acetato miristato de forbol (PMA) é um composto sintético e atua mimetizando o DAG, não ocorrendo a liberação de Ca²⁺ para o citosol quando este estímulo é utilizado (NELSON; COX, 2000). A PKC juntamente com o fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)

leva à fosforilação e ativação de outras proteínas, a exemplos dos componentes citoplasmáticos do sistema NADPH oxidase que apresenta papel fundamental na produção de EROs (SELVATICI *et al.*, 2006).

Há bastante tempo é sabido que a quimiluminescência dependente de luminol é largamente dependente das reações do sistema MPO - H₂O₂ - Cl⁻ (DAHLGREEN; STENDHAL, 1983). No entanto, outras EROs também estão envolvidas na quimiluminescência gerada e, como consenso, o luminol, por ser uma molécula pequena que consegue penetrar na célula, reflete a produção total de EROs nos eventos intra e extra celulares (PARIJ *et al.*, 1998).

Utilizando esta abordagem, foi demonstrado que a prévia incubação dos neutrófilos com MoCBP4 (10 µM) reduziu consideravelmente a quimiluminescência, comprovando um efeito inibitório direto da MoCBP4 sobre a produção de EROs por neutrófilos ativados. Este resultado reforça o dado anteriormente mostrado sobre a atividade reduzida de MPO nos tecidos. Em análise conjunta destes dados, sugerimos que a MoCBP4 reduz a migração dos neutrófilos para o foco inflamatório provavelmente por diminuir as interações entre neutrófilo-selectina, além de atenuar a ativação destas células no foco inflamatório, reduzindo a amplificação da resposta inflamatória.

Contraopondo-se ao nosso resultado, as lectinas Con A, WGA e a aglutinina de *Viscum album* foram capazes de desencadear a ativação do sistema NADPH oxidase e produção de H₂O₂ por neutrófilos humanos (OHNO *et al.*, 1992; TIMOSHENCO; GABIUS, 1993; TIMOSHENCO *et al.*, 1995). Em outro estudo, foi demonstrado que as proteínas quinase C, fosfolipase D e PI3K são necessárias para a ativação do sistema NADPH-oxidase induzida por WGA (KARLSSON, 1999).

Apesar da MoCBP4 ter apresentado efeitos significativos em todas as doses testadas, no sentido de reduzir o número de animais utilizados e a quantidade de proteína, elegemos a dose intermediária de MoCBP4 (40 mg/kg) para prosseguir com as próximas investigações, pois em análise histológica a menor dose (20mg/kg) não apresentou resultado protetor frente a necrose pancreática (dado não mostrado).

Logo após a fase inicial da PA, a qual é caracterizada pela ativação do tripsinogênio com subsequente ativação das células acinares, ocorre a segunda fase que é marcada pelo aumento da expressão de proteínas de membrana e moléculas de adesão, tais como ICAM-1, com subsequente aumento do influxo de leucócitos

para o pâncreas (JUANG *et al.*, 2008). Os leucócitos elevam o dano pancreático local, resultando em aumento da ativação de novas células e aceleram a produção local de citocinas inflamatórias (IL1- β , IL-6, IL-8 e TNF- α), que por sua vez amplificam a resposta inflamatória (MAYER *et al.*, 2000; MEWS *et al.*, 2002; CAVALLINI; FRULLONI, 2003; HONG-SHAN *et al.*, 2003).

Além dos leucócitos e monócitos, as células acinares ativadas e as células do interstício pancreático, conhecidas como células estelares, promovem a síntese de citocinas (MASAMUNE *et al.*, 2002). Os níveis de citocinas intra-pancreáticas atingem concentrações elevadas quando comparadas aos níveis séricos sistêmicos correspondentes, indicando que as citocinas são produzidas no próprio pâncreas durante a pancreatite (BAE *et al.*, 2012). A síntese de citocinas, uma vez iniciada, atingirá outros órgãos através da corrente sanguínea, configurando a Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) (PARTENITI *et al.*, 2012).

A inibição de citocinas pró-inflamatórias é crucial para atenuar a severidade da PA (MALLEO *et al.*, 2008). Baticioglu e col. (2009) demonstraram que a gravidade da pancreatite aguda foi reduzida em animais “knockouts” para receptores de TNF- α e IL1- β . De acordo com Sandler e col. (2012), o TNF- α provoca a ativação inicial de proteases e a necrose das células acinares, além de ser fundamental para o desenvolvimento da lesão de órgãos extra-pancreáticos, sendo esta citocina um importante alvo a ser inibido para reduzir a gravidade da pancreatite aguda (MALLEO *et al.*, 2007). Já foi descrito que o bloqueio de IL1- β pelo uso do seu antagonista específico, IL-1ra, reduz a gravidade da pancreatite aguda induzida por dieta e ceruleína (MALLEO *et al.*, 2008; CERANOWICZ, 2009). O aumento da concentração de IL-6 é altamente preditivo para a gravidade da pancreatite aguda, bem como a falência múltipla de órgãos, destacando-se o comprometimento pulmonar, via recrutamento de células inflamatórias (HUANG, 2012; ZHANG *et al.*, 2013).

Diante das constatações prévias, as quais mencionam que as citocinas pró-inflamatórias são prejudiciais para o prognóstico e desfecho clínico da pancreatite, foi avaliada a atividade da MoCBP4 sobre estes mediadores. Demonstrou-se que o pré-tratamento com MoCBP4 nos animais com pancreatite foi eficiente em reduzir as concentrações de TNF- α e IL-1 β tanto no plasma como no pâncreas, reduzindo também os níveis pancreáticos de IL-6. Complementando o resultado obtido pela técnica de ELISA, foi realizado também a técnica de imunohistoquímica para TNF- α

no tecido pancreático, e observou-se uma redução da imunomarcagem desta citocina. Em conjunto, estes dados se complementam e reforçam, mais uma vez, a atividade protetora local e sistêmica da MoCBP4 frente ao tratamento com ceruleína. Sugerimos que a MoCBP4 reduz inicialmente a secreção ou a produção destas citocinas a nível pancreático que, por sua vez, influenciam nas concentrações plasmáticas.

Em concordância com os dados deste estudo, a MoCBP4 em trabalho anterior, administrada na mesma dose e via, foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 β e aumentar os níveis de IL-10 no plasma de animais submetidos a peritonite por zymosan (PEREIRA, 2014). Outras lectinas vegetais também foram hábeis em atenuar os níveis das citocinas TNF- α e IL-1 β em modelos experimentais clássicos de inflamação aguda. A lectina de *Canavalia grandiflora*, em peritonite induzida por zymosan, reduziu os níveis destas citocinas no fluido peritoneal (NUNES *et al.*, 2009); a lectina de *Lochocarpus sericeus* inibiu a migração de neutrófilos induzida por carragenina e também diminuiu os níveis de IL-1 β e TNF- α , tanto na pata como no exsudato peritoneal (NAPIMOGA *et al.*, 2007); em adição, a lectina das sementes de *Bauhinia bauhinioides* Mart demonstrou semelhante efeito sobre estes mediadores (GIRAÃO *et al.*, 2015).

O início da síntese de citocinas é mediado por uma proteína heterodimérica composta por duas subunidades (p50 e p65), denominada como fator nuclear de transcrição κ B (NF- κ B). Esta proteína está presente no citosol na sua forma inativa devido à ligação com proteínas inibidoras, denominadas I κ B-a e I κ B-b. Muitos produtos bacterianos e virais, além de radicais livres, citocinas e lipídios, ativam o NF- κ B através da degradação do I κ B-a devido a sua fosforilação por quinases, a IKK α e a IKK β . NF- κ B quando ativado se transloca para o núcleo, onde se ligará a regiões promotoras de variados genes, resultando em *upregulation* e subsequente produção de mediadores inflamatórios tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α , óxido nítrico-sintase (iNOS) e Cicloxigenase II (COX-2) (GRISHAM, 1999).

O NF- κ B desempenha papel central no desenvolvimento da PA (RAKONCZAY *et al.*, 2008). A ativação deste fator em modelos *in vitro* e *in vivo* de pancreatite aguda induzida por ceruleína já foi comprovada em diversos trabalhos (BAE *et al.*, 2013; AHN *et al.*, 2013; KIN, *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2014). Na PA induzida por ceruleína, animais geneticamente modificados com hiperexpressão de NF- κ B apresentaram maior gravidade da pancreatite com expressão aumentada de IL1- β

IL-6 e TNF- α . A hiperatividade persistente de NF- κ B nestes animais levou ao desenvolvimento de pancreatite crônica com aumento da expressão de fatores pró-fibrinogênicos, TGF- β e fibronectina (HUANG *et al.*, 2013).

Diante da importância do NF- κ B na patogênese da pancreatite e a necessidade de investigar o provável mecanismo envolvido no potente efeito antiinflamatório da MoCBP4 aqui demonstrado, o próximo passo foi avaliar a possível interferência desta lectina sobre a expressão do NF- κ B no tecido pancreático. Para tanto, utilizamos a técnica de imunofluorescência e visualizamos uma menor marcação nuclear no pâncreas de animais com pancreatite aguda tratados com MoCBP4, indicando menor translocação nuclear do NF- κ B neste grupo experimental.

Em trabalho anterior foi demonstrado que o extrato etanólico das vagens de *Moringa oleifera* reduziu a produção de mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos murinos estimulados com LPS. Este extrato exibiu efeito dose-dependente ao reduzir a produção de óxido nítrico, a expressão de iNOS e COX-2, bem como a secreção de TNF- α e IL-6, além de atuar inibindo as proteínas MAPk (ERK, p38 e JNK) e NF- κ B ao inibir a fosforilação de I κ B- α (MUANGNOI *et al.*, 2012). O extrato de acetato de etila das folhas de *Moringa oleifera* reduziu a translocação nuclear de NF- κ B, por aumentar a produção de I κ B- α (ARUSELVAN *et al.*, 2016).

Mesmo diante destes efeitos da *Moringa oleifera* sobre mecanismos específicos de inibição do NF- κ B, não podemos extrapolar tal mecanismo para explicar o efeito da MoCBP4 observado no presente estudo. Entretanto, estes trabalhos orientam investigações futuras que se fazem necessárias para esclarecer por qual via a MoCBP4 conduz a redução da translocação do NF- κ B para o núcleo das células acinares neste modelo experimental.

Muitas evidências sugerem que o estresse oxidativo e a inflamação desempenham papéis centrais na patogênese e nas complicações da pancreatite aguda. A formação de espécies reativas de oxigênio através da peroxidação lipídica tem sido observada tanto em pacientes como em modelos experimentais de pancreatite aguda (SCHULZ *et al.*, 1999, TELEK *et al.*, 2001; You; KIM, 2014; LEE *et al.*, 2012; AL-MALKI, 2015). O estresse oxidativo excessivo também está correlacionado a amplificação dos processos inflamatórios por meio da ativação de NF- κ B e subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias (YAO *et al.*, 2015).

Os níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂) e de COX-2 são *upregulados* em pacientes e animais com pancreatite aguda (FOITZIC *et al.*, 2003, SONG *et al.*, 2002, YAN *et al.*, 2004) e a inibição da produção de PGE₂ reduz a produção de citocinas, tais como a IL-6, resultando em diminuição dos riscos da síndrome de resposta inflamatória sistêmica (BHATIA *et al.*, 2000; FOITZIK *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2002).

O infiltrado inflamatório tecidual decorrente da resposta inflamatória inicial é em parte responsável pela grande produção de EROs na PA necrosante experimental (LONG *et al.*, 2005). Em adição, Tisuji e col. (1994) demonstraram que os neutrófilos obtidos de pacientes com pancreatite produzem maior quantidade de EROs. Reforçando o papel de EROs na pancreatite, trabalhos comprovaram o efeito de compostos com atividade antioxidante no tratamento desta doença e atestam que o controle do estresse oxidativo consiste em uma importante estratégia para controlar o quadro inflamatório e a lesão tecidual (CARVALHO *et al.*, 2010; SOWJANYA; SANDHY; VEERESH, 2012; SZABOLCS *et al.*, 2006).

Outro mediador importante na pancreatite investigado neste trabalho foi o óxido nítrico (NO), o qual tem sido apontado por estar envolvido no desenvolvimento das complicações sistêmicas e locais da pancreatite aguda, bem como no estresse oxidativo, o que é característico nos estados mais graves (TAKÁCS *et al.*, 2002). É sabido que a produção aumentada de NO, por indução de iNOS, está envolvida na patogênese do choque e inflamação (SU *et al.*, 2010) e evidências sugerem que alguns dos efeitos citotóxicos do NO ocorrem devido a formação de peroxinitrito, um oxidante reativo formado pela rápida reação do NO com o radical superóxido (SUGIURA; ICHINOSE, 2011). A formação de peroxinitrito pode induzir consideravelmente o estresse oxidativo com subsequente peroxidação lipídica, a qual é comprovada por aumento dos níveis de malonaldeído. Em contrapartida, é válido destacar que o NO também apresenta efeitos benéficos na pancreatite experimental por ativar a microcirculação, a oxigenação pancreática e reduzir a adesão de neutrófilos (LEUNG; CLAN, 2009; SÁNCHEZ-BERNAL *et al.*, 2004), de modo que, o papel exato deste mediador na pancreatite ainda é incerto. Acredita-se que o NO produzido fisiologicamente pelas células acinares esteja implicado na homeostase, e que variações consideráveis na concentração de NO culmina na perda desta homeostase (CHVANOV; PETERSEN; TEPIKIN, 2005).

A glutationa reduzida (GSH) é o principal grupo sulfidríla não proteico (NP-SH) e desempenha importante papel na manutenção de proteínas celulares e lipídios no seu estado funcional normal, além de participar do sistema endógeno de defesa celular contra danos oxidativos (ROSS, 1988). Estudo anterior demonstra que a redução dos níveis GSH está relacionada com aumento de necrose nos acinos pancreáticos estimulados com ceruleína (ALSFASSER *et al.*, 2002). Outro estudo mostrou que a depleção de GSH ocorre já na fase inicial da pancreatite aguda (GOMEZ-CAMBRONERO *et al.*, 2000).

A lipoperoxidação foi estimada pela detecção dos derivados dos lipoperóxidos, através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o malonaldeído (MDA). O MDA é um indicador de peroxidação lipídica na membrana plasmática. A lesão na estrutura celular da membrana leva a interrupção no transporte intracelular de enzimas digestivas, ativação prematura dessas enzimas e danos nas células acinares. Também é possível que o colapso na permeabilidade capilar causada por dano oxidativo seja a origem do edema na pancreatite aguda (BATCIOGLU *et al.*, 2009).

A administração de ceruleína aumenta consideravelmente os níveis de MDA e reduzem atividade da GST (Glutathione-S-transferase) e os níveis de GSH. Este desequilíbrio entre compostos oxidante e antioxidantes contribui para a evolução da cascata inflamatória envolvida no desenvolvimento da pancreatite aguda (ESREFOGLU *et al.*, 2006; MALLEO *et al.*, 2007; ARAFA, 2009). Os achados do presente trabalho mostraram que o tratamento com MoCBP4 na dose de 40 mg/kg foi hábil em reduzir o estresse oxidativo no tecido pancreático devido a sua capacidade de aumentar os níveis de GSH e reduzir os níveis de MDA.

Compilando todos os dados apresentados até o momento, podemos concluir que além de reduzir os níveis locais e sistêmicos das citocinas pró-inflamatórias, provavelmente por inibição do NF- κ B, a MoCBP4 foi capaz de diminuir a migração de neutrófilos para o pâncreas, pulmão e fígado e de atenuar a ativação destas células via redução da síntese de EROs. Em adição, houve manutenção dos níveis fisiológicos de GSH e menor peroxidação lipídica, com consequente diminuição da necrose no pâncreas, como foi demonstrado pela análise histológica.

Em conformidade com os nossos dados, estudo recente comprovou efeito antioxidante das sementes de *Moringa oleifera* em modelo experimental de estresse oxidativo hepático induzido por dieta rica em gordura (DAS; GANGULI; DEY, 2015).

Neste trabalho os camundongos tratados com *M. oleifera* apresentaram diminuição dos níveis de GSH, da superóxido dismutase (SOD) e catalase, além da redução da peroxidação lipídica e dos níveis de nitrito no tecido hepático. Em modelo de lesão renal aguda, a lectina de *Dioclea violacea* reduziu os níveis do ânio superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e óxido nítrico na medula renal. Entretanto, nesse estudo não foi investigada a capacidade desta lectina em interferir nos níveis de GSH, SOD ou catalase (FREITAS *et al.*, 2015). Outras proteínas vegetais, não lectínicas, também apresentaram tal atividade antioxidante ao incrementar níveis de GSH e reduzir peroxidação lipídica tanto em articulações quanto em patas de camundongos injetadas com agentes flogísticos (KUMAR *et al.*, 2011; 2015).

Com relação aos níveis de nitrito, o pré-tratamento com MoCBP4 foi capaz de reduzir significativamente tanto os níveis plasmáticos, como também os níveis pancreáticos, mantendo-os semelhantes aos níveis quantificados nos animais saudáveis. Complementando este dado, demonstramos que o tratamento com MoCBP4 atenuou a imunexpressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos pâncreas de animais com pancreatite aguda. Este dado nos leva a considerar que a redução dos níveis de NO é consequência de sua menor produção pela iNOS.

Sabe-se que o óxido nítrico é um importante inibidor endógeno da adesão leucocitária, pois atua reduzindo a expressão de moléculas de adesão com consequente redução da transmigração leucocitária (KUBES *et al.*, 1991; SECCO *et al.*, 2006). Diferente dos nossos dados aqui colocados, as lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora*, *Pisum arvense* e *Concanavalina A* induziram a produção de NO *in vitro* e *in vivo* por macrófagos peritoneais, quando administradas localmente (ANDRADE *et al.*, 1999). Posteriormente, em outro estudo *in vitro*, demonstrou-se que macrófagos murinos isolados do peritônio e tratados com a lectina de *Concanavalina A* induziram a expressão de iNOS por diferentes ligantes aos receptores Toll-like (SODHI *et al.*, 2007). Em contrapartida, nos modelos de inflamação aguda *in vivo*, as lectinas de *Luetzelburgia auriculata* e de *Hypnea cervicornis* apresentaram redução da migração de neutrófilos, provavelmente por aumentar o NO plasmático (FIGUEIREDO *et al.*, 2010; ALENCAR *et al.*, 2010).

Podemos afirmar que a MoCBP4 foi capaz de modular os níveis de NO no plasma e pâncreas dos animais com pancreatite, ou seja, esta lectina foi eficiente em mantê-lo a níveis fisiológicos, favorecendo a homeostase sistêmica e local mesmo nos animais com PA. Como hipótese, podemos sugerir que a MoCBP4

esteja interferindo na produção da iNOS via inibição de NFκB. Em adição, podemos afirmar que a redução da migração de neutrófilos para o pâncreas dos animais com pancreatite tratados com MoCBP4 não foi mediada por NO, considerando que esta proteína não interferiu com o NO plasmático e tecidual.

A ciclooxigenase (COX) é uma enzima responsável por catalisar o metabolismo do ácido araquidônico em prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (NEEDLEMAN *et al.*, 1986). A COX do tipo 2 (COX-2) é a isoforma indutível normalmente detectada em processos inflamatórios, inclusive na PA (STEINLE *et al.*, 1999; GUKOVSKY *et al.*, 1998). Estudos prévios evidenciaram a contribuição essencial desta enzima no desenvolvimento da PA induzida por ceruleína (ETHRIDGE *et al.*, 2002; HAYASHI *et al.*, 2007). O aumento da expressão desta enzima está correlacionado com o aumento das citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1β, IL-6 e TNF-α e ativação de NFκB (SEROU; DE COSTER; BAZAN, 1999; GUAN *et al.*, 1998; DIAZ *et al.*, 1998). Em contrapartida, as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 suprimiram a expressão da COX-2 (ALAAEDDINE *et al.*, 1999; NIRO *et al.*, 1998; REDDY *et al.*, 1994).

Neste trabalho, comprovamos que a MoCBP4 foi capaz de reduzir significativamente a imunomarcação da COX-2 no pâncreas de animais com pancreatite. Podemos sugerir que esta redução pode ser consequência da diminuição de citocinas pró-inflamatórias e da ativação de NF-κB. Em trabalho de Aruselvan e col. (2016), o extrato das folhas de *Moringa oleifera* reduziu a produção de prostaglandina em macrófagos isolados previamente estimulados com LPS. Porém não se sabe a real composição deste extrato, não tendo sido deixado claro a atividade de possíveis lectinas neste efeito. No trabalho de LUZ (2013), proteínas vegetais purificadas a partir do látex de *Calotropis procera* foram capazes de reduzir níveis de prostaglandina em patas estimuladas por carragenina via redução da síntese de TNF-α e IL-1β.

A segunda parte deste trabalho teve como proposta avaliar o efeito direto da MoCBP4 sobre células acinares pancreáticas isoladas a partir de camundongos saudáveis. Para tanto, utilizou-se a colecistocinina-8 (CCK) em concentrações supra máximas (10 nM), a qual leva a hiperestimulação da célula acinar, evidenciada por aumento global e sustentado de Ca²⁺ intracelular (MURPHY *et al.*, 2008; CRIDDLE *et al.*, 2009). Esta elevação anormal de Ca²⁺ induz a ativação precoce dos grânulos de zimogênio, perda do potencial da membrana mitocondrial, resultando em redução

da produção de ATP e posterior necrose celular (MURKHERJEE *et al.*, 2015). Reforçando a importância do Ca^{2+} na pancreatite, outros trabalhos demonstram que a quelatação deste íon impede o aparecimento de vacúolos em células acinares *in vitro* e reduz a gravidade da PA *in vivo* (SALUJA *et al.*, 1999; RARATY *et al.*, 2000; MOOREN *et al.*, 2003). O bloqueio de canal específico de Ca^{2+} , conhecido como SOCE, reduz a sobrecarga de Ca^{2+} intracelular e a necrose tanto em células acinares de pâncreas de rato como de humano (GERASIMENKO *et al.*, 2013; WEN *et al.*, 2015).

Com o intuito de investigar a atividade da MoCBP4 sobre as células acinares estimuladas com CCK, avaliou-se os níveis de Ca^{2+} no citosol, por meio da mensuração da intensidade do Fluo-4. Nesta abordagem foram avaliadas três concentrações de MoCBP4, 0,1 μM , 1 μM e 10 μM , porém apenas a concentração intermediária apresentou efeito significativo ao reduzir o nível sustentado de Ca^{2+} (platô) mantido por CCK.

Em seguida utilizamos células acinares estimuladas com TLC-S, um sal biliar normalmente utilizado para induzir necrose celular por aumentar as concentrações de Ca^{2+} citosólico e mitocondrial via receptores de trifosfato de inositol (IP3R) e receptores de rianodina (BOOTH *et al.*, 2011). Nesta abordagem avaliamos apenas a concentração de 1 μM de MoCBP4, pois foi apenas nesta que observamos efeito significativo sobre os níveis de Ca^{2+} citosólico. A pré-incubação das células acinares com MoCBP4 preveniu consideravelmente a necrose provocada por TLC-S.

Compilando tais dados, podemos sugerir que a MoCBP4 reduz inicialmente o aumento global e sustentado de Ca^{2+} no citosol de células acinares e, por esta razão, é capaz atenuar a necrose celular.

Em concordância com os nossos dados, as lectinas vegetais de germe de trigo (WGA), *Ulex europaeus agglutinina* (UEA-I) e *Phaseolus vulgaris agglutinina* (PHA) também foram capazes de reduzir significativamente os níveis de Ca^{2+} no citosol de células acinares estimuladas por CCK (JONAS *et al.*, 1995). Sabe-se que os dois tipos de receptores de CCK são proteínas altamente glicosiladas e WGA, uma lectina que possui como açúcar específico N-acetilglucosamina, consegue se ligar à parte glicídica destes receptores, estabelecendo competição alostérica com a ceruleína, o que possibilita o efeito protetor contra a hiper-estimulação das células do pâncreas exócrino no modelo experimental de PA (DAMM *et al.*, 2004).

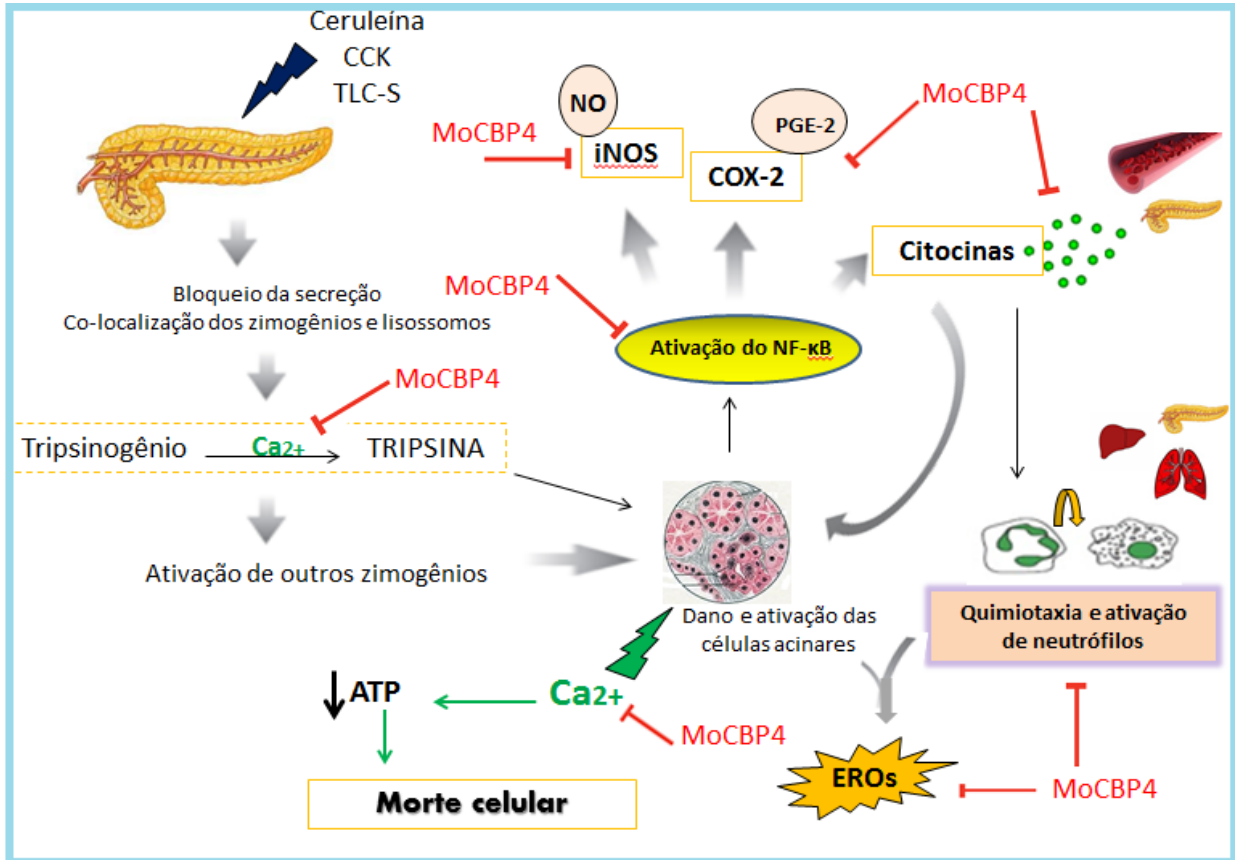
Em estudo recente, as lectinas das leguminosas *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Canavalia ensiformis* (ConA) demonstraram efeito protetor sobre células acinares pancreáticas ao inibirem a necrose e a perda do potencial da membrana mitocondrial induzidas por TLC-S, etanol e ácido palmitoleico, sendo estes efeitos dependentes dos seus respectivos domínios lectínicos (DAMASCENO, 2015).

Por fim, os resultados produzidos neste estudo são consistentes e sugerem que a MoCBP4 reduz o processo inflamatório local e sistêmico característicos da pancreatite aguda edematosa provocada por ceruleína, via diminuição de importantes mediadores pró-inflamatórios, redução da participação dos neutrófilos, modulação estresse oxidativo e diminuição dos íons cálcio no citosol de células acinares, os quais estão diretamente relacionados à patogênese e gravidade desta doença. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados com o intuito de evidenciar os mecanismos específicos envolvidos nos efeitos aqui demonstrados no modelo experimental de pancreatite aguda induzida por ceruleína.

Em paralelo às nossas investigações biológicas, estudos que caracterizam estruturalmente a MoCBP4 continuam a avançar. Em estudo prévio, foi demonstrado que esta lectina apresenta estrutura heterodimérica rica em resíduos de glutamina e aminoácidos básicos, além de destacar a elevada estabilidade estrutural da MoCBP4 frente às altas temperaturas, aos variados pH e às enzimas digestivas, verificando relevante efeito biológico quando administrada por via oral. Ademais, a MoCBP4 comprovou a sua elevada segurança biológica tanto em modelos experimentais *in vivo* como *in vitro* (PEREIRA, 2014).

A relevante atividade da MoCBP4 evidenciada neste trabalho aliam-se à caracterização estrutural e segurança biológica desta proteína, e por estas razões, a MoCBP4 pode ser credenciada como uma ferramenta potente a ser explorada com possível utilização na elaboração de fármaco que possa ser usado como alternativa para o tratamento e cura da pancreatite aguda.

Figura 23: Modelo hipotético para a ação da MoCBP4 na pancreatite aguda experimental e sobre células acinares.



MoCBP4 atua reduzindo os níveis patológicos sustentado de Ca^{2+} no citosol das células acinares, que, por vez, reduz a ativação prematura do tripsinogênio no pâncreas. Esta redução de Ca^{2+} citosólico provocada pela MoCBP4 parece estar diretamente correlacionada com a redução da necrose celular. No tocante à resposta inflamatória, a MoCBP4 foi capaz de reduzir a translocação nuclear do NF- κ B e, provavelmente por esta razão, ocorreu a diminuição de importantes mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese e gravidade da PA, tais como: TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 e iNOS. Em adição, a MoCBP4 atenuou a transmigração de neutrófilos para o pâncreas, pulmão e fígado, além de reduzir a produção de EROs por estas células. A MoCBP4 reduziu a peroxidação lipídica (MDA) e manteve os níveis normais de NP-SH e nitrito no pâncreas.

8. Conclusão

A MoCBP4, uma lectina purificada a partir das sementes de *Moringa oleifera*, foi capaz de atenuar a progressão da resposta inflamatória local e sistêmica conferidas no modelo experimental de pancreatite aguda induzida por ceruleína, através da:

- diminuição das atividades plasmáticas das enzimas correlacionadas às funções pancreática (amilase / lipase) e hepática (AST / ALT);
- diminuição da atividade de mieloperoxidase no pâncreas, pulmão e fígado, além da redução da ativação dos neutrófilos, via diminuição da síntese de espécies reativas de oxigênio por estas células;
- redução dos níveis pancreáticos das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e, também, dos níveis plasmáticos de TNF- α , IL-1 β ;
- redução do estresse oxidativo no pâncreas via modulação dos níveis pancreáticos de NP-SH, MDA e nitrito;
- Diminuição da expressão no pâncreas da citocina TNF- α , das enzimas COX-2 / iNOS e do fator de transcrição nuclear (NF- κ B);
- redução dos níveis elevados e sustentados do íon cálcio no citosol das células acinares;
- atenuação da morte celular por necrose das células acinares.

9. Referências bibliográficas

ABDULL RAZIS A.F.; IBRAHIM M.D.; KNTAYYA S.B. Health benefits of *Moringa oleifera*. **Asian Pac J Cancer Prev.**, v. 15, n. 20, p. 8571-6, 2014.

ABDULL RAZIS, A. F.; IBRAHIM, M.D.; KNTAVVA, S. B. Health benefits of *Moringa oleifera*. **Asian Pac J Cancer Prev.**, v. 15 (20), p. 8571-6, 2014.

ABDULLA, A.; AWLA, D.; HARTMAN, H.; WEIBER, H.; JEPPSSON, B; REGNÉR, S; THORLACIUS, H. Platelets regulate P-selectin expression and leukocyte rolling in inflamed venules of the pancreas. **Eur J Pharmacol.**, v. 5, 682(1-3), p. 153-60, 2012.

ABDULLA, A.; AWLA, D.; THORLACIUS, H.; REGNÉR, S. Role of neutrophils in the activation of trypsinogen in severe acute pancreatitis. **J Leukoc Biol.**, v. 90, p. 975-982, 2011.

AGAR, E.; BOŞNAK, M.; AMANVERMEZ, R.; DEMİR, S.; AYYILDIZ, M.; CELİK, C. The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. **Neuroreport.**, v. 10(8), p. 1799-801, 1999.

AHN, D. W.; RYU, J. K.; KIM, J.; KIM, Y. T.; YOON, Y. B.; LEE, K.; HONG, J. T. Inflexinol reduces severity of acute pancreatitis by inhibiting nuclear factor- κ B. **Pancreas.**, v. 42 (2), p. 279-84, 2013.

AJIT K; CHOUDHARY BK; BANDYOPADHYAY NG. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **J Ethnopharmacol.**, v.84, p.105-8, 2002.

ALENCAR, N. M. N.; ASSREUY, A. M. S.; CRIDDLE, D. N.; SOUZA, E. P.; SOARES, P. M. G.; HAVT, A.; ARAGÃO, K. S.; BEZERRA, D. P.; RIBEIRO, R. A.; CAVADA, B. S. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Protein and Peptide Letters**, v. 11, n. 2, p.195–200, 2004.

ALENCAR, N. M. N. et al An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. **Inflammation Research**, v. 59, p. 245-254, 2010.

ALENCAR, N. M.; OLIVEIRA, R. S.; FIGUEIREDO, J. G.; CAVALCANTE, I. J.; MATOS, M. P.; CUNHA, F. Q.; NUNES, J. V.; BOMFIM, L. R.; RAMOS, M. V. Epub 2009 Sep 12. An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. **Inflammation Research**, v.59, p. 245-254, 2010.

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.

AL-MALKI, A. L. Suppression of acute pancreatitis by L-lysine in mice. **BMC Complement Altern Med.**, v. 15, p. 193.

ALONSO, R.; RUBIO, L. A.; MUNIZ, M.; MARZO, F. The effect of extrusion cooking on mineral bioavailability in pea and kidney bean seeds meal. **Animal Food Science and Technology**, v. 94, n. 1-2, p. 1-13, 2001.

ALSFASSER, G.; GOCK, M, HERZOG, L.; GEBHARD, M. M.; HERFARTH, C.; KLAR, E.; SCHMIDT, J. Glutathione depletion with L-buthionine-(S,R)-sulfoximine demonstrates deleterious effects in acute pancreatitis of the rat. **Dig Dis Sci**, v. 47, p. 1793-1799, 2002.

ALTAVILLA, D. et al. Attenuated Cerulein-Induced Pancreatitis in Nuclear Factor- κ B-Deficient Mice. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 12, p. 1723–1732, 2003.
AMAYA, D.R. et al. Moringa: hortaliça arbórea rica em beta-caroteno. **Horticultura Brasileira**, v.10, p.126, 1992.

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.

ARAFI, H. M.; HEMEIDA, R. A.; HASSAN, M. I.; ABDEL-WAHAB, M. H.; BADARY, O. A.; HAMADA, F. M. Acetyl-L-carnitine ameliorates caerulein induced acute pancreatitis in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v.105, p. 30-36, 2009.

ARORA D.S.; ONSARE J.M.; KUAR H. Bioprospecting of Moringa
ARUSELVAN, P.; TAN, W. S.; GOTHAI, S.; MUNIANDY, K.; FAKURAZI, S.; ESA, N. M.; ALARFAJ, A. A.; KUMAR, S. S. Anti-Inflammatory Potential of Ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* in downregulation the NF-Kb signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Molecules**, v. 21, 2016.

ASENSIO, J. L. et al. Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. **Chemical Biology**, v. 7, p. 529–543, 2000.

ASSREUY A.M.S.; SHIBUYA M.D.; MARTINS G.J.; SOUSA M.L.P.; CAVADA B.S.; MOREIRA R.A.; et al. Anti-inflammatory effect of glucose–mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators Inflamm.**, v.6, p.201-10, 1997.

Assreuy AM, Martins GJ, Moreira EE, Brito GA, Cavada BS, Ribeiro RA et al 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-ASSREUY, A. M. et al. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the **Canavalia** genus. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**,v. 380, p. 509-21, 2009.

ASSREUY, A. M. S.; SOUSA, A. A. S. ; Benevides NM ; PIRES, A.F. ; FIUZA, F. P. ; QUEIRÓZ, Maria Goretti Rodrigues de ; MORAIS, T. M. F. ; PEREIRA, M. G. . A report of a galactan from marine alga *Gelidium crinale* with in vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, p. 173-180, 2013.

AWADH A; JULICH WD; KUSNICK C; et al. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. **J Ethnopharmacol**, v. 74, p.173-9, 2001.

BAE, G. S.; HEO, K. H.; PARK, K. C.; CHOI, S. B.; JO, I. J.; SEO, S. H.; KIM, D. G.; SHIN, J. Y.; KANG, D. G.; LEE, H. S.; SONG, H. J.; SHIN, B. C.; PARK, S. J. Apamin attenuated cerulein-induced acute pancreatitis by inhibition of JNK pathway in mice. **Dig Dis Sci**, v. 58(10), p. 2908-2917, 2013.

BAE, G. S.; KIM, M. S.; PARK, K. C.; KOO, B. S.; JO, I. J.; CHOI, S. B.; LEE, D. S.; KIM, Y. C.; KIM, T. H.; SEO, S. W.; SHIN, Y. K.; SONG, H. J.; PARK, S. J. Effect of biologically active fraction of *Nardostachys jatamansi* on cerulean induced acute pancreatitis. **World J Gastroenterol.**, v. 18(25): 3223-3234, 2012.

BAGGIOLONI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S.L. Neutrophil-activating peptide-1 interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. **J Clin Invest**, v.84, p.1045-1049, 1989.

BAKIR, M.; GEYIKOGLU, F.; COLAK, S.; TURKEZ, H.; BAKIR, T.O.; HOSSEINIGOUZDAGANI, M. The carvacrol ameliorates acute pancreatitis-induced liver injury via antioxidant response. **Cytotechnology**,v.68, n.4, p.1131-46, 2016.

BANG, U. C.; SEMB, S.; NOJGAARD, C.; BENDTSEN, F. Pharmacological approach Bto acute pancreatitis. **World Journal of Gastroenterology**. v. 14, p. 2968-2976, 2008.

BAO, Z; GUAN, S; CHENG, C; WU, S; WONG, S.H; KEMENY, D.M; LEUNG, B.P; WONG, W.S. A novel antiinflammatory role for andrographolide in asthma via inhibition of the nuclear factor-kappaB pathway. **Am J Respir Crit Care Med.**,v. 15;179(8), p. 657-65, 2009.

BARRAL-NETTO, M. et al. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, p. 297-303, 1992.

BARROSO-NETO, I. L. et al. Vasorelaxant activity of *Canavalia grandiflora* seed lectin: Astructural analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 543, p. 31–39, 2014.

BATCIOGLU, K.; GUL, M.; UYUMLU, A.B.; ESREFOGLU, M. Liver lipid peroxidation and antioxidant capacity in cerulein-induced acute pancreatitis. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, no 9, p.776-782, 2009.

BECKNGHAM, J.; BORNMAN, P. C. ABC of diseases of liver, pancreas, and biliary system. Acute pancreatitis. **BMJ.**, v. 322, p. 595-598, 2001.

BEGER, H. G.; RAU, B.; MAYER, J.; PRALLE, U. Natural course of acute pancreatitis. **World J Surg.**, v. 21, p. 130-135, 1997.

BENNLIER, E.; ESKIOCAK, S.; PUYAN, F.O.; et al. Fucoidin, a neutrophil rolling inhibitor, reduces damage in a rat electrical burn injury model. **Burns**, v. 37, p.1216-21, 2011.

BENTO, C. A .M.; et al. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Inflammation Research**, v. 38, p. 48-54, 1993.

BERKOVICH, L. et al. *Moringa oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappa B and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1-7, 2013.

BEZERRA, E.H.S.; ROCHA, B.A.M.; NAGANO, C.S.; BEZERRA, G.D.A.; MOURA, T.R.; BEZERRA, M.J.B.; et al. Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**,v. 408, p. 566–57, 2011.

BHATIA, M.; WONG, F.L.; CAO, Y.; LAU, H.Y.; HUANG, J.; PUNEET, P.; CHEVALI, L. Pathophysiology of acute pancreatitis. **Pancreatology.**, v. 5(2-3), p. 132-144, 2005.

BHATIA, M. et al. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. **Journal Pathology**, v.190, p.117-25, 2000.

BHATIA, M.; SALUJA, A.K.; HOFBAUER, B.; FROSSARD, J.L.; LEE H.S.; CASTAGLIUOLO, I.; WANG, C.C.; GERARD, N.; POTHOUKAKIS, C.; STEER, M.L. Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. **Proc Natl Acad Sci.**v. 95, p. 4760-4765, 1998.

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

BOOTH DM1, MUKHERJEE R, SUTTON R, CRIDDLE DN. Calcium and reactive oxygen species in acute pancreatitis: friend or foe? **Antioxid Redox Signal.**, v.15, n. 10, p. 2683-98, 2011.

BOS A.; WEVER R.; ROOS D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. **Biochim Biophys Acta**, v.525, p.37-44, 1978.

BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 9, p. 77, 1968.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol.**,v. 78, p. 206-209, 1982.

BRUN, A.; AGARWAL, N.; PITCHUMONI, C. S. Fluid collections in and around the pancreas in acute pancreatitis. **J Clin Gastroenterol**, v. 45, p. 614-625, 2011.

BUSIREDDY, K. K. Pancreatitis-imaging approach. **World Journal Gastrointestinal Pathophysiology**, v.5, n.3, p.252-270, 2014.

C.P. Chang, M.C. Yang, H.S Liu, Y.S. Lin, H.Y Lei. *Concanavalin A* induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology**, v. 2, p. 286-296, 2007.

CÁCERES, A. et al. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*: screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36(3), p. 233-237, 1992.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICCOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 60-78, 2007.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CARROLL, J. K.; HERRICK, B.; GIPSON, T.; LEE, S. P. Acute pancreatitis: diagnosis, prognosis, and treatment. **Am Fam Physician**, v. 75, p. 1513-20, 2007.

CARVALHO A.C.; SOUSA R.B.; FRANCO A.X.; COSTA J.V.; NEVES L.M.; RIBEIRO R.A.; SUTTON R.; CRIDDLE D.N.; SOARES P.M.; DE SOUZA, M. H. Protective effects of fucoidan, a P- and L-selectin inhibitor, in murine acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 43 n.1, p. 82-7, 2014.

CARVALHO, K. M. M. B. et al. The natural flavonoid quercetin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n.9, p. 1534–1539, 2010.

CAVADA, B. S ; MOREIRA, L. I. M. ; RAMOS, M .V. ; GALVANI, F. R. ; GRANGEIRO, T .B .; LEITE, K .B. ; ASSREUY, A .M. ; CAJAZEIRAS, J .B. ; CALVETE, J .J . Seed lectin from *Pisum arvense*: isolation, biochemical characterization and amino acid sequence. **Protein and Peptide Letters**, v. 10, n.6, p. 607-617, 2003.

CAVALCANTE, T. T. A. et al. Effect of Lectins from *Diocleinae* Subtribe against Oral Streptococci. **Molecules**, v. 16, p. 3530-3543, 2011.

CAVALLINI, G.; FRULLONI, L. Antiproteasic agents in the prevention of post-ERCP pancreatitis: rationale for use and clinical results. **JOP**, v.4, n.4, p.75-82, 2003.

CERANOWICZ, Z.; WARZECHA, A.; DEMBINSKI, J.; CIESZKOWSKI, M.; DEMBINSKI, R.; SENDUR, B.; KUSNIERZ-CABALA, R.; TOMASZEWSKA, A.;

KUWAHARA, I. Pretreatment with obestatin inhibits the development of cerulein-induced pancreatitis. **JPF**, v.60, no 3, p.95-101,2009.

CHAN, Y. C.; LEUNG, P. S. Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. **Pancreas**, v. 34, p. 1-14, 2007.

CHEN, J. et al. Netrin-1 Protects against L-Arginine-Induced Acute Pancreatitis in Mice. **PLoS ONE**, v. 7, p. e46201, 2012.

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.

CHUANG, P. H. et al. Antifungal activity of crude extracts and essential oils of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 232-236, 2007.

CHVANOV, M.; PETERSEN, O. H.; TEPIKIN, A. Free radicals and the pancreatic acinar cells: role in physiology and pathology. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1464, p. 2273–2284, 2005.

COELHO, A. M. M.; KUBRUSLY, M. S.; BONIZZIA, A.; GONÇALEZ, Y.; ABDO, E. E.; MACHADO, M. C. C. Efeito protetor da depleção de enzimas pancreáticas na evolução da pancreatite aguda. Estudo experimental em ratos. **Rev Hosp Clin Fac Med**, v. 48, p. 106-111, 1993.

COELHO, A. M. M.; MACHADO, M. C. C.; CUNHA, J. E. M.; SAMPIETRE, S. M.; ABDO, E. E. Influence of pancreatic enzyme content on experimental acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 26, p. 230-234, 2003.

COELHO, R. C. Análise toxicológica e avaliação da estabilidade de uma proteína ligante à quitina isolada de sementes de *Moringa oleifera* como perspectiva de sua utilização como um biofármaco. Monografia (Bacharelado em Biologia) - Universidade Federal do Ceará, 2013.

CRIDDLE, D. N.; GILLIES, S.; BAUMGARTNER-WILSON, H. K.; JAFFAR, M.; CHINJE, E. C.; PASSMORE, S.; CHVANOV, M.; BARROW, S.; GERASIMENKO, O. V.; TEPIKIN, A. V.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H. Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. **J Biol Chem.**, v. 281, p. 40485-40492, 2006.

CRIDDLE, D. N.; BOOTH, D. M.; MUKHERJEE, R.; MCLAUGHLIN, E.; GREEN, G. M.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H.; REEVE, JR. Cholecystokinin-58 and cholecystokinin-8 exhibit similar actions on calcium signaling, zymogen secretion, and cell fate in murine pancreatic acinar cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 297, p. 1085-1092, 2009.

CRIDDLE, D. N.; BOOTH, D. M.; MUKHERJEE, R.; et al. Cholecystokinin-58 and cholecystokinin-8 exhibit similar actions on calcium signaling, zymogen secretion, and cell fate in murine pancreatic acinar cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 297, p. 1085-1092, 2009.

CRIDDLE, D.N.; MURPHY, J.; FISTETTO, G.; BARROW, S.; TEPIKIN, A.V.; NEOPTOLEMOS, J. P.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H. Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis. **Gastroenterology**, v. 130, p. 781–93, 2006.

CUNHA C.R.; DA SILVA L.C.; ALMEIDA F.J.; FERRAZ M.S.; VAREJÃO N.; CARTAXO M.F.; DE MIRANDA R.C.; DE AGUIAR F.C.; JR; SANTOS N.P.; COELHO L.C.; SANTOS-MAGALHÃES N.S.; CORREIA M.T. Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant *Cratylia mollis* Lectin Expressed in Escherichia. **Front Microbiol.**, v.16, p.7-1355, 2016.

CUNHA, F.Q.; BOUKILI, M.A.; MOTTA, J.I.B.; et al. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur J Pharmacol**, v. 238, p. 47-52, 1993.

CYSNE, J. R. B. Propagação in vitro de *Moringa oleifera* L. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, 2006.

DAHLGREN C.; STENDAHL O. Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Infect Immun.**, v. 39, n. 2, p. 736-41, 1983.

DAMM, I.; MIKKAT, U.; KIRCHHOFF, F.; BÖCKMANN, S; JONAS, L. Inhibitory effect of the lectin wheat germ agglutinin on the binding of 125I-cck-8s to the cck-a and -b receptors of ar42j cells. **Pancreas**, v. 28(1), p. 31-37, 2004.

DAN, N.; GANGULI, D.; DEY, S. *Moringa oleifera* lam. Seed extract prevents fat diet induced oxidative stress in mice and protects liver cell-nuclei from hydroxyl radical mediated damage. **Indian J Exp boil.**, v. 53, p. 794-802, 2015.

DASTUR, J. F. Medicinal plants of Indian and Pakistan. **D. B. Taraporevala and Co: Delphi**, p. 113-114, 1977.

DEMOLS, A.; DEVIERE, J. New frontiers in the pharmacological prevention of post-ERCPDENNIS, J. W.; NABI, I. R.; DEMETRIOU, M. Metabolism, cell surface organization, and disease. **Cell**, v. 139, p. 1229-1241, 2009.

DEMOLS, A.; DEVIERE, J. New frontiers in the pharmacological prevention of post-ERCP pancreatitis: the cytokines. **JOP** , Genova, v.4, n.1, p.49-57, 2003.

DIAZ A.; CHEPENIK K.P.; KORN J.H.; REGINATO A.M.; JIMENEZ S.A. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 and 2 by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 in human lung fibroblasts. **Exp Cell Res.**, v. 241, p. 222-9, 1998.

DOHERTY, N. S. et al. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, p. 769-89, 1985.

DUONG L.T.;HADAC E.M.; MILLER L.J.; LASUK G.P.Purification and characterization of the rat pancreatic cholecystinin receptor. **JBiolChem.**, v.264, p.17990–6, 1989.

EBERT C.; NEBE B.; WALZEL H.; WEBER H.; JONAS L. Inhibitory effect of the lectin wheat germ agglutinin (WGA) on the proliferation of AR42J cells. **Acta Histochem.**, v.111, n.4, p.335-42, 2009.

EL-DEMERDASH F.; YOUSEF M.; EL-NAGA N. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. **Food Chem Toxicol.**, v.43, p.57–63, 2005.

ELFAR, M.; GABER, L. W.; SABEK, O.; FISCHER, C. P.; GABER, A. O. The inflammatory cascade in acute pancreatitis: Relevance to clinical disease. **Surg. Clin. N. Am.**,v. 87, p. 1325-1340, 2007.

ESCOTT-STUMP, S. Nutrição relacionada ao diagnóstico e tratamento. 5. ed. Barueri, SP: Manole, 2007.

EŞREFOĞLU M.; GÜL M.; ATES B.; BATÇIOĞLU K.; SELIMOĞLU M.A. Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. **World J Gastroenterol**, v.12, n.2, p.259-64, 2006.

ESREFOGLU, M.; GUL, M.; ATES, B.; BATCIOGLU, K.; SELIMOGLU, M.A. Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. **World J Gastroenterol.**,v. 12(2), p. 259-264, 2006.

ETHRIDGE, R.T.; CHUNG, D.H.; SLOGOFF, M.; EHLERS, R.A.; HELLMICH, M.R.; RAJARAMAN, S.; SAITO, H.; UCHIDA, T.;EVERS, B.M. Cyclooxygenase-2 gene disruption attenuates the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. **Gastroenterology**, v. 123, p. 1311-1322, 2002.

FAN, B. G.; ANDRÉN-SANDBERG, A. Acute pancreatitis. **North American journal of medical sciences**, v. 2, p. 211–214, 2010.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 431-437, 2008.

FIGUEIREDO, I.S.T. ; BITENCOURT F. DA S. ; CAVADA B. S. ; CUNHA F. Q. ; CUNHA, T.M. ; ALENCAR N. M. N. Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: Involvement of nitric oxide. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 96, p. 371-377, 2010.

FOIDL, N.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER K. The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In: The Miracle Tree/ The Multiple Attributes of Moringa, Ed. Lowell J Fuglie, CTA. USA, 2001.

FOITZIK T.; HOTZ HG.; HOTZ B.; WITTIG F.; BUHR H.J. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) reduces prostaglandin E2 production and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. **Hepatogastroenterology**, v. 50, p. 1159-62, 2003.

FOITZIK, T.; FERNANDEZ-DEL-CASTILO, C.; FERRARO, M.J.; MITHOFER, K.; RATTNER, D.W.; WARSHAW, A.L. Pathogenesis and prevention of early pancreatic infection in experimental acute necrotizing pancreatitis. **Ann Surg.**, v. 222, p. 179-185, 1995.

FRANCIS, J. A.; JAYAPRAKASAM, B.; OLSON, L. K.; NAIR, M. G. Insulin secretagogues from *Moringa oleifera* with cyclooxygenase enzyme and lipid peroxidation inhibitory activities. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, p. 317-326, 2004.

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.

FREITAS, F. P. S.; PORTO, M. L.; TRANHAGO, C. P.; PIONTKOWSKI, R.; MIGUEL, E, C.; MIGUEL, T. B.; MARTINS, J. L.; NASCIMENTO, K. S.; BALARINIS, C. M.; CAVADA, B. S.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C.; GAVA, A. L. *Dioclea violácea* lectin ameliorates oxidative stress and renal dysfunction in na experimental modelo f acute kidney injury. **Am J Transl**, v. 7, p. 2573-2588, 2015.

FROSSARD, J.L.; STEER, M.L.; PASTOR, C.M. Acute pancreatitis. **Lancet**, v.371, p. 143-152, 2008.

FROSSARD, J.L.; SALUJA, A.; BHAGAT, L. The role of intracellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis associated lung injury. **Gastroenterology**, v. 116, p. 694-701, 1999.

FU, L.; ZHOU, C.; YAO, S.; YU, J.; LIU, B.; BAO, J. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**,v. 43, p. 1442-1449, 2011.

GADELHA C. A.; MORENO, F. B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J. B.; ROCHA,B. A.; ASSREUY, A. M.; MOTA, M. R. L.; PINTO, N.V.; PASSOS MEIRELES, A.V.; BORGES, J. C.; FREITAS, B. T.; CANDURI, F.; SOUZA, E. P.; DELATORRE, P.; CRIDDLE, D.N.; AZEVEDO JR., W. F.; CAVADA, B.S. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **J Struct Biol**, v. 152, n. 3, p.185-94, 2005.

GALLÃO, M. I; DAMASCENO, L. F; BRITO, E.S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 37(1), p.106-109, 2006.

GARDNER, J. D. Regulation of pancreatic exocrine function in vitro: initial steps in the actions of secretagogues. **Annual review of physiology**, v. 41, p. 55–66, 1979.

GEA-SORLÍ, S.; GUILLAMAT, R.; SRRANO-MOLLAR, A.; CLOSA, D. Activation of lung macrophage subpopulations in experimental acute pancreatitis. **J Pathol**, v. 223, p. 417-424, 2011.

Gemeiner, P., Mislovicová, D., Tkác, J., Svitel, J., Pätoprstý, V., Hrabárová, E., et al. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, p. 1–15, 2009.

GERASIMENKO, J. V.; GRYSHCHENKO, O.; FERDEK, P. E.; et al. Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel blockade as a potential tool in antipancreatitis therapy. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 110, p. 13186-13191, 2013.

GIFONI, J. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, H. D.; BATISTA, A. B.; PEREIRA, M. L.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, H. P.; GRANGEIRO, T. B.; VASCONCELOS, I. M. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Peptide Science**, v. 98, p. 406-415, 2012.

GILANI, A. H. et al. Pharmacological studies on hypotensive and spasmolytic activities of purê compounds from *Moringa oleifera*. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 87-91, 1994.

GIRÃO, D. K.; CAVADA, B. S.; DE FREITAS PIRES, A.; MARTINS, T. V.; FRANCO, Á. X.; MORAIS, C. M.; SANTIAGO DO NASCIMENTO, K.; DELATORRE, P.; DA SILVA, H. C.; NAGANO, C. S.; ASSREUY, A. M.; SOARES, P. M. The galactose binding lectin isolated from *Bauhinia bauhinioides* Mart seeds inhibits neutrophil rolling and adhesion via primary cytokines, **J Mol Recognit**, v. 28(5), p. 285-292, 2015.

GOMES, J. C. et al. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans: comparison with *Concanavalin A*. **Inflammation Research**, v. 41, p. 132-135, 1994.

GÓMES-CAMBRONERO, L.; CAMPS, B.; DE LA ASUNCIÓN, J. G.; CERDÁ, M.; PELLÍN, A.; PALLARDÓ, F. V.; CALVETE, J.; SWEIRY, J. H.; MANN, G. E.; VIÑA, J.; SASTRE, J. Pentoxifylline ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats: role of glutathione and nitric oxide. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 293, p. 670-676, 2000.

GRADY, T.; MAH'MOUD, M.; OTANI, T.; RHEE, S.; LERCH, M. M.; GORELICK, F. S. Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. **Am J Physiol**, v. 275, p. 1010-1017, 1998.

GRANGER, J.; REMICK, D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. **Shock**, v. 24, p. 45–51, 2005.

GRANGEIRO, 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.

GRISHAM, M.B. NF-κB activation in acute pancreatitis: protective, detrimental, or inconsequential? **Gastroenterology**, v. 116, n.2, p.489-492, 1999.

GROSVENOR PW; GOTHARD PK; WILLIAM MC; et al. Medicinal plants from Riau province, Sumatra, Indonesia. **J Ethnopharmacol**, v.45, p.75-95, 1995.

GUAN Z.; BUCKMAN S.Y.; MILLER B.W.; SPRINGER L.D.; MORRISON A.R. Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells. **J Biol Chem.**, v.273, p. 28670-28676, 1998.

GUKOVSKAYA, A. S.; MOURIA, M.; GUKOVSKY, I.; REYES, C. N.; KASHO, V. N.; FALLER, L. D.; PANDOL, S. J. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. **Gastroenterology**, v. 122, n. 1, p.106–118, 2002.

GUKOVSKY, I.; GUKOVSKAYA, A. S.; BLINMAN, T. A.; ZANINOVIC, V.; PANDOL, S. J. Early NF-kappaB activation is associated with hormone induced pancreatitis. **Am J Physiol.**, v. 275, p. G1402–G1414, 1998.

HAJJAR, N.A; IANCU, C; BODEA, R. Modern therapeutic approach of acute severe forms of pancreatitis. A review of the literature and experience of Surgical Department No III Cluj. **Chirurgia (Bucur)**, v. 107(5), p. 605-610, 2012.

HALONEN, K.I; PETTILA, V; LEPPANIEMI, A.K; KEMPPAINEN, E.A; PUOLAKKAINEN, P.A; HAAPIAINEN, R.K. Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis. **Crit Care Med**. v.30(6), p.1274-9, 2002.

HAMZA, A. A. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 345–355, 2010.

HAMZA, A. A. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* lam seed extract on liver fibrosis in rats. **Food Chem Toxicol.**, v. 48, p. 345-355, 2010.

HARTMAN, H; ABDULLA, A; AWLA, D; LINDKVIST, B; JEPPSSON, B; THORLACIUS, H; REGNER, S. P-selectin mediates neutrophil rolling and recruitment in acute pancreatitis. **Br J Surg.**, v.99(2), p.246-55, 2012.

HAYASHI T1, ISHIDA Y, KIMURA A, IWAKURA Y, MUKAIDA N, KONDO T. IFN-gamma protects cerulein-induced acute pancreatitis by repressing NF-kappa B activation. **J Immunol.**, v. 178, n.11, p. 7385-94, 2007.

HEINRICH, E. L.; WELTY, L. A. Y.; BANNER, L. R.; OPPENHEIMER, S. B. Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. **Acta Histochem.**, v. 107, p. 335-344, 2005.

HIROTA, M.; OHMURAYA, M.; BABA, H. The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. **J gastroenterol.**, v. 41(9), p. 832–836, 2006.

HIROTA, M; NOZAWA, F; OKABE, A; SHIBATA, M; BEPPU, T; SHIMADA, S; EGAMI, H; YAMAGUCHI, Y; IKEI, S; OKAJIMA, T; OKAMOTO, K; OGAWA, M.

Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis. **Pancreas**, v.21(2), p.141-146, 2000.

HONG-SHAN, L. et al. Effect of NF-KB and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis. **World J. Gastroenterol.**, v.9, n.11, p.2513-2518, 2003.

HUANG GJ; DENG JS; HUANG SS; et al. Protective effect of antrosterol from *Antrodia camphorata* submerged whole broth against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. **Food Chem**, v.132, p.709-16, 2012.

HUANG, H.; LIU, Y.; DANILUK, J.; GAISER, S.; CHU, J.; WANG, H.; LI, Z. S.; LOGSDON, C. D.; JI, D. Activation of nuclear factor- κ B in acinar cells increases the severity of pancreatitis in mice. **Gastroenterology**, v. 144(1), p. 202-210, 2013.

HUANG, L.; WANG, M. H.; CHENQ, Z. Y.; XUE, P.; JIN, T.; YANG, X. N.; XIA, Q. [Epub ahead of print]. Effects of Chai-Qin-Cheng-Qi decoction on acute pancreatitis-associated lung injury in mice with acute necrotizing pancreatitis. **Chin J Integr Med.**, 2012.

HUANG, W.; BOOTH, D. W.; CANE, M. C.; CHVANOV, M.; JAVED, M. A.; ELLIOTT, V. L.; ARMSTRONG, J. A.; DINGS DALE, H.; CASH, N.; LI, Y.; GREENHALF, W.; MUKHERJEE, R.; KAPHALIA, B. S.; JAFFAR, M.; PETERSEN, O. H.; TEPIKIN, A. V.; SUTTON, R.; CRIDDLE, D. N. Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca^{2+} -dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis. **Gut**, v. 63, p.1313-1324, 2014.

Jahn S. A. A.; Musnad H.A.; Burgstaller H. The tree that purifies water. Cultivating multipurpose Moringaceae in the Sudan. **Unasyiva**, v. 38, p. 23-28, 1986.

JAI SWAL D; RAI PK; MEHTA S; et al. Role of moringa oleifera in regulation of diabetes-induced oxidative stress. **Asian Pac J Trop Med**, v.6, p.426-32, 2013.

JAIQUES, A. V. et al. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 836–842, 2013.

JIANG, K.; HUANG, W.; YANG, X. N.; XIA, Q. Present and future of prophylactic antibiotics for severe acute pancreatitis. **World J Gastroenterol**, v.18(3), p. 279-284, 2012.

JONAS LUDWIG; MIKKAT ULRIKE; WITTE ANKE; BECKMANN UTA; DÖLKER KATRIN; WEBER HEIKE; HAHNEL CHRISTIAN; KUNDT GÜNTHER; NIZZE HORST. Morphometric measurements to quantify the cerulein induced hyperstimulatory pancreatitis of rats under the protective effect of lectins. **Analytical Cellular Pathology**, v. 17, n. 4, p. 219-230, 1998.

JONAS, L.; FULDA, G.; DAMM, I.; NEBE, B.; RYCHLY, J. Flow cytometric measurements of intracellular Ca^{2+} mobilization in isolated rat pancreatic acinar cells

after hormone stimulation and action of lectins. **Acta Histochem**, v. 97, p. 81-88, 1995.

JONES, A. K.; JANABI, M.A; SOLANKI, K.; SOBNACK, R.; GREENWOOD, A.; DOYLE, et al. In vivo leukocyte migration in arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.34, p. 270-275, 1991.

Kang GH, Yan BC, Cho GS et al Neuroprotective effect of fucoidin on lipopolysaccharide accelerated cerebral ischemic injury through inhibition of cytokine expression and neutrophil infiltration. **J Neurol Sci.**, v.318, p. 25-30, 2012.

KARLSSON, A. Wheat germ agglutinin induces NADPH-oxidase activity in human neutrophils by interaction with mobilizable receptors. **Infect Immun**, v. 67(7), p. 3461-3468, 1999.

KAUFMANN, A.; RÖSSLER, O. G.; THIEL, G. Expression of the transcription factor Egr-1 in pancreatic acinar cells following stimulation of cholecystokinin or Gαq-coupled designer receptors. **Cell Physiol Biochem**, v. 33, p. 1411-145, 2014.

KELLY D.M.Oxygen consumption predicts outcome in porcine partial liver grafts. **J Surg Res.**, v.189, p.335–339, 2014.

KHAWAJA TM; TAHIRA M; IKRAM UK. *Moringa oleifera*: a natural gift - A review. **J Pharm Sci Res**, v.2, p. 775-81, 2010.

KIM, M. J.; BAE, G. S.; JO, I. J.; CHOI, S.B.; KIM, D. G.; SHIN, J. Y.; LEE, S. K.; KIM, M. J.; SHIN, S.; SONG, H. J.; PARK, S. J. Loganin protects against pancreatitis by inhibiting NF-κB activation. **Eur J Pharmacol**, v. 765, p. 541-550, 2015.

KOLAR, J. C.; ELLIS, C.J.; HEVITT, M.D. Comparison of serum amylase pancreatic isoamylase and lipase in patients with hyperamylasemia. **Dig Dis Sci**, v.29, p. 289-293, 1984.

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.

KUDI AC; UHOH JU; EDUVIE LO. Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, v.67, p.225-8, 1999.

KUMAR V.L.; GURUPRASAD B.; CHAUDHARY P.; FATMI S.M.; OLIVEIRA R.S.; RAMOS M.V.Protective effect of proteins derived from *Calotropis procera* latex against acute inflammation in rat. **Auton Autacoid Pharmacol**, v. 35, n. 1-2, p. 1-8, 2015.

KUMAR, V.L., CHAUDHARY, P., RAMOS, M.V., MOHAN, M. & MATOS, M.P. KUNO, A.; UCHIYAMA, N.; KOSEKI-KUNO, S.; EBE, Y.; TAKASHIMA, S.; YAMADA, M.; HIRABAYASHI, J. Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. **Nature Methods**, v. 2, p. 851-856, 2005.

LAI TY; WENG YJ; KUOI WW. Taohe Chengqi Tang ameliorates acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. **J Chin Integr Med**, v.8, p.49-55 2010.

LEE H.J.; JEONG Y.J.; LEE T.S.; PARK Y.Y.; CHAE W.G.; CHUNG I.K.; CHANG H.W.; KIM C.H.; CHOI Y.H.; KIM W.J.; MOON S.K.; CHANG Y.C. Moringa fruit inhibits LPS-induced NO/iNOS expression through suppressing the NF- κ B activation in RAW264.7 cells. **Am J Chin Med.**, v.41, n.5, p. 1109-23, 2013.

LEE, W.; KU, S.-K.; BAE, J.-S. Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 9, p.3048–3055, set. 2012.

LESER, H. G.; GROSS, C.; SCHEIBENBOGEN, C. et al. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute phase response and reflects severity in acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 101, p. 782-785, 1991.

LEUNG, P.S.; IP, S.P. Pancreatic acinar cell: Its role in acute pancreatitis. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 1024-1030, 2006.

LEUNG, P. S.; CHAN, Y. C. Role of Oxidative Stress in Pancreatic Inflammation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 1, p. 135–166, 2009.

Li, W., Yu, J., Xu, H., Bao, J. *Concanavalin A*: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 414, p. 282–286, 2011.

LIMA, P.R.; DE MELO, T.S.; CARVALHO, K.M.; DE OLIVEIRA, I. B.; ARRUDA, B.R.; DE CASTRO BRITO, G. A.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. 1,8- Cineole (eucalyptol) ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis via modulation of cytokines, oxidative stress and NF-Kb activity in mice. **Life Sci.**, v. 92, P. 24-26, 2013.

LIN Z.S.; KU C.F.; GUAN Y.F.; XIAO H.T.; SHI X.K.; WANG H.Q.; BIAN Z.X.; TSANG S.W.; ZHANG H.J. Dihydro- Resveratrol Ameliorates Lung Injury in Rats with Cerulein-Induced Acute Pancreatitis. **Phytother Res.**, v.30, n.4, p.663-70, 2016.

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

LIU, Z. et al. Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? **Cell Proliferation**, v. 46, p. 509–515, 2013.

LOPES, T. D. P. Potencial antidermatofítico de Mo-CBP4, uma proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleífera*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 347, 2002.

MAHAJAN, S. G.; MEHTA, A. A. Immunosuppressive activity of ethanolic extract of seeds of *Moringa oleifera* Lam. In experimental immune inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 183–186, 2010.

MAJEE, S. B.; BISWAS, G. R. Exploring plant lectins in diagnosis, prophylaxis and therapy. **J. Med. Plant Res.**, v. 7, p. 3444-3451, 2013.

MALECH, H.L.; GALLIN, J.I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, p. 687–694, 1987.

MALLEO, G.; MAZZON, E.; GENOVESE, T.; DI PAOLA, R.; MUIA, C.; CRISAFULLI, C.; SIRIWARDENA, A. K.; CUZZOCREA, S. Effects of thalidomide in a mouse model of cerulein-induced acute pancreatitis. **Shock**, v. 29, no. 1, p. 89-97, 2008.

MALLEO, G.; MAZZON, E.; SIRIWARDENA, A.K.; CUZZOCREA S. TNF-alpha as a therapeutic target in acute pancreatitis--lessons from experimental models. **Scientific World Journal**, v.7, p.431-48, 2007.

MANTOVANI, A.; BISWAS, S. K.; GALDIERO, M. R.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **J Pathol**, v. 229, p, 176-185, 2013.

MASAMUNE A.; SAKAI Y.; KIKUTA K.; SATOH M.; SATOH A.; SHIMOSEGAWA T. Activated rat pancreatic stellate cells express intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro. **Pancreas**, v.25, n.1, p. 78-85, 2002.

MATOZAKI T.;GO K.E.B;TSUNODA T.;RODRIGUES.M.;MARTINEZ J.; WILLIAMS J.A.Two functionally distinct cholecystokinin receptors show different models of action on Ca^{++} mobilization and phospholipids hydrolysis in isolated rat pancreatic acini. Studies using ganew cholecysto- kinin analog JMV180. **J Biol Chem.**, v.265, p.6247–54, 1990.

MAYER, J. et al. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. **Gut**, v.47, p.546–552, 2000.

MEIRELLES JR., R. F. et al. Reactive oxygen species inactivation improves pancreatic capillary blood flow in cerulein-induced pancreatitis in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, p. 29–33, 2003.

MELO, C. M.; MORAIS, T. C.; TOME, A. R.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Anti-inflammatory effect of a,b-amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Inflamm.**, v. 60, p. 673-681, 2011.

MERZA, M. et al. Inhibition of geranylgeranyltransferase attenuates neutrophil accumulation and tissue injury in severe acute pancreatitis. **Journal of leukocyte biology**, v. 94, n. 3, p. 493–502, set. 2013.

MEWS P.; PHILLIPS P.; FAHMY R.; KORSTEN M.; PIROLA R.; WILSON J.; APTE M. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. **Gut**, v.50, n.4, p. 535-41, 2002.

MIKKAT U.; DAMM I.; KIRCHHOF F.F.;ALBRECH T.E.;NEBE B.;JONAS L. Effects of lectin on CCK-8 stimulate enzyme secretion and differentiation of the rat pancreatic cell line AR42J. **Pancreas**, v. 23, p. 368-74,2001.

MIKKAT, U.; DAMM, I.; SCHRÖDER, G.; SCHMIDT, K.; WIRTH, C.; WEBER, H.; JONAS, L. Effect of the lectins wheat germ agglutinin (WGA) and *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I) on the alpha-amylase secretion of rat pancreas in vitro and in vivo. **Pancreas**, v. 16, p. 529-538, 1998.

MILLER L.J.;HADACEM,GATESLK,GAISANOHY.Binding of a phenethyl ester analog of cholecystinin to the solubilized pancreatic cholecystinin receptor: use in ligand-affinity chromatography. **Biochem Biophys Res Commun**, v.183, p.396–404, 1992.

MINKO T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 491–509, 2004.

MISLOVIČOVÁ, D. et al. Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. **Biologia**, v. 64, p. 1-19, 2009.

MITCHELL, S. W. Researches upon the venom of the rattlesnake. **Smithson Contrib Knowl**, v. XII, p. 89-90, 1860.

MOOREN, F.; HLOUSCHEC, V.; FINKES, T.; et al. Early changes in pancreatic acinar cell calcium signaling after pancreatic duct obstruction. **J Biol Chem**, v. 278, p. 9361-9369, 2003.

MOREIRA, et al. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* l. seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1183-1188, 1998.

MORGAN, D. E. Imaging of acute pancreatitis and its complications. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 6, p. 1077-1085, 2008.

Morton J. F. The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae): a boon to arid lands? **Journal of Economic Botany**, v. 45(3), p. 318-333, 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.

MUANGNOI C, et al. *Moringa oleifera* pod inhibits inflammatory mediator production by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell lines. **Inflammation**, v. 35, p. 445-55, 2012.

MUKHERJEE, R.; MARENINOVA, O. A.; ODINOKOVA, I. V, et al. Mechanism of mitochondrial permeability transition pore induction and damage in the pâncreas: inhibition prevents acute pancreatitis by protecting production of ATP. **Gut**, 2015.

MURDOCK, L.L., HUESING, J.E., NIELSEN, S.S., PRATT, R.C., and SHADE, R.E. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry**, v. 29, p. 85-89, 1990.

MURPHY, J. A.; CRIDDLE, D. N.; SHERWOOD, M. et al. Direct activation of cytosolic Ca²⁺ signaling and enzyme secretion by cholecystokinin in human pancreatic acinar cell. **Gastroenterology**, v. 135, p. 632-641, 2008.

MUTINGA, M.; ROSENBLUTH, A.; TENNER, S. M.; ODZE, R. R.; SICA, G. T.; BANKS, P. A. Does mortality occur early or late in acute pancreatitis? **Int J Pancreatol.**, v. 28, p. 91-95, 2000.

NAPIMOGA, M. H.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M.; MOTA, M. L.; BITTEBCOURT, F. S.; ALVES-FILHO, J. C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R. B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; DE FREITAS, A.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting eytokine and chemokines production. **Int Immunopharmacol**, v. 7(6), p. 824-835, 2007.

NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKWITH, J. B. Arachidonic acid metabolism. **Annu Rev Biochem**, v. 55, p. 69-102, 1986.

NEUHÖFER, P.; SONG, L.; RABE, B.; LESINA, M.; KURKOWSHI, M. U.; TREIBER, M.; WARTMANN, T.; REGNÉR, S.; THORLACIUS, H.; SAUR, D.; WEIRICH, G.; YOSHIMURA, A.; HALANGK, W.; MIZGERD, J. P.; SCHMID, R. M.; ROSE-JOHN, S.; ALGÜL H. trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality. **J Clin Invest**, v. 123, p. 1019-1031, 2013.

NEVES, P.L. Inflamação Na Doença Renal Crônica. Tese (Doutorado) Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, 2008.

WEIDENBACH, H.; WAGNER, M.; ADLER, G.; SCHMID, R. M. NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. **Gastroenterology**, v.116, p. 420-430, 1999.

NIIRO H.; OTSUKA T.; OGAMI E.; YAMAOKA K.; NAGANO S.; AKAHOSHI M.; NAKASHIMA H.; ARINOBU Y.; IZUHARA K.; NIHO Y. MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit COX-2 expression in human monocytes. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 250, p. 200-205, 1998.

NORMAN, J. G.; FINK, G. W.; FRANZ, M. G. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. **Arch Surg**, v. 130, p. 966-970, 1995.

NORMAN, J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. **Am J Surg**, v. 175, p. 76–83, 1998.

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

O'CONNOR, O. J.; BUCKLEY, J. M.; MAHER, M. M. Imaging of the complications of acute pancreatitis. **AJR Am J Roentgenol**, v. 197, p. w375-381, 2011.

OHNO, Y. I.; HIRAI, K. I.; KANO, T.; UCHINO, H.; OGAWA, K. Subcellular localization of hydrogen peroxide production in human polymorphonuclear leukocytes stimulated with lectins, phorbol myristate acetate, and digitonin: an electron microscopic study using CeCl₃. **Blood**, v. 60(5), p. 1195-1202.

ONSARE; JG; KAUR; H; ARORA; DS. Antimicrobial activity of *Moringa oleifera* from different locations against some human pathogens. **J Med Plants**, v.1, p.80-91, 2013.

OSTERNE, V. J.; SILVA-FILHO, J. C.; SANTIAGO, M. Q.; PINTO-JUNIOR, V. R.; ALMEIDA, A. C.; BARRETO, A. A.; WOLIN, I. A.; NASCIMENTO, A. P.; AMORIM, R. M.; ROCHA, B. A.; DELATORRE, P.; NEGANO, C. S.; LEAL, R.B.; ASSREUY, A. M.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **Int J Biol Macromol**, v. 94a, p. 271-281, 2017.

PALANISAMY, A.; WOAN, S. T.; SIVAPRAGASAM, G.; KATYAKYINI, M.; SHARIDA, F.; NORHAIZAN, M. E.; ABDULLAH, A.; ALARFAJ.; S. SURESH, K. Antiflammatory potential of ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* in downregulating the nf- κ signaling pathway in lipopolysaccharide- Stimulated macrophages. **Molecules**, v. 21(11), p. 1452, 2016.

PALANISAMY, V.; KUMARESAN, K., Studies on seed development and maturation in annual *Moringa*. **Vegetable Science**, v. 12, p. 74-78, 1985.

PANDA, S.; et al. Cardioprotective potential of N,α-L-rhamnopyranosyl vincosamide, an indole alkaloid, isolated from the leaves of *Moringa oleifera* in isoproterenol induced cardiotoxic rats: In vivo and in vitro studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 959-962, 2013.

PANDOL, S. J. Acute pancreatitis. **Curr Opin Gastroenterol**. v. 22, p. 481-486, 2010.

PARIJ, N.; NAGY, A.M.; FONDU, P.; NÈVE, J. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils. **Eur J Pharmacol**, v.352, p.299-305, 1998.

PASTOR, C. M.; MATTHAY, M. A.; FROSSARD J. L. Pancreatitis-associated acute lung injury. **Chest**, v. 124, p. 2341-2351, 2003.

PATERNITI I.; MAZZON E.; RICCARDI L.; GALUPPO M.; IMPELLIZZERI D.; ESPOSITO E.; BRAMANTI P.; CAPPELLANI A.; CUZZOCREA S. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist GW0742 ameliorates cerulein- and taurocholate-induced acute pancreatitis in mice. **Surgery**, v. 152, n.1, p. 90-106, 2012.

PAULA P.C.; OLIVEIRA J.T.; SOUSA D.O.; ALVES B.G.; CARVALHO A.F.; VASCONCELOS A. M. Insulin-like plant proteins as potential innovative drugs to treat diabetes-The *Moringa oleifera* case study. **N Biotechnol**, v. 16, p. 32460-8, 2016.

PEARSON RK, MILLER LJ, HADAC EM, POWERS SP. Analysis of the carbohydrate composition of the pancreatic plasma membrane glycoprotein affinity labelled by short probes for the cholecystokinin receptor. **J Biol Chem.**, v.262, p. 13850–6, 1987.

PEIXOTO, J.R.; SILVA, G.C.; COSTA, R.A.; et al. In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. **Asian Pac J Trop Med**, v.4, p. 201-4, 2011.

PEREIRA, M. L.; et al. Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds with potential to relieve pain and inflammation. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, p. 1078-1085, 2011.

PEREIRA, M.L. Aspectos estruturais, farmacológicos e toxicológicos de Mo-CBP4, uma proteína ligante à quitina de *Moringa oleifera* com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva via oral. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, 2014.

PEREIRA, M.L.; OLIVEIRA, H.D.; OLIVEIRA, J.T.A.; GIFONI, J.M.; ROCHA, R.O.; SOUSA, D.O.B.; VASCONCELOS, I.M. Purification of a Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Seeds with Potential to Relieve Pain and Inflammation. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, p. 1078-1085, 2011.

PETERSEN, O. H.; TEPIKIN, A. V. Polarized calcium signaling in exocrine gland cells. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 70, p.273–299, 2008.

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. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends Food Science Technology**, v. 7, n. 4, p. 132-138, 1996.

PIRES, A. F.; RODRIGUES, N. V.; SOARES, P. M.; RIBEIRO, RDE. A.; ARAGÃO, K S.; MARINHO, M. M.; DA SILVA, M. T.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. A novel N-acetyl-glucosamine lectin of *Lonchocarpus araripensis* attenuates acute cellular inflammation in mice. **Inflamm Res**, v. 65, p. 43-52, 2016.

POIROT S.S.; ESCRICUT C.; DUFRESNE M.; MARTINEZ J.; BOUISSON M.; VAYSSE N.; et al. Photo affinity labeling of rat pancreatic cholecystokinin type A

receptor antagonist binding sites demonstrates the presence of a truncated cholecystinin type A receptor. **Mol Pharmacol.**, v.45, p.599–607, 1994.

POORAN, N.; INDARAM A.; SINGH P.; BANK S. Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. **J Clin Gastroenterol**, v. 37, p. 263-266, 2003.

RAIKHEL, N. V.; LEE, H. I. Structure and function of chitin-binding proteins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 591–615, 1993.

RAKONCZAY, Z. JR.; HEGYI, P.; DÓSA, S.; IVÁNYI, B.; JÁRMAY, K.; BICZÓ, G.; HRACSKÓ, Z.; VARGA, I. S.; KARG, E.; KASZAKI, J.; VARRÓ, A.; LONOVICS, J.; BOROS, I.; GUKOVSKY, I.; GUKOVSKAYA, A. S.; PANDOL, S. J.; TAKÁCS, T. A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L ornithine in rats. **Crit Care Med**, v. 36(7), p. 2117-27, 2008.

RAKONCZAY, Z. JR.; HEGYU, P.; TAKÁCS, T.; MCCARROLL, J.; SALUJA, A. K. The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. **Gut**, v. 57(2), p. 259-267, 2007.

RAKONCZAY, Z. NF-κB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 6, p. 696–709, 2003.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K. V.; Gopalakrishnan P.K. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. **Journal of Economic Botany**, v. 34(3) p. 276-283, 1980.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN; P.K.; DRUMSTICK. *Moringa oleifera*: a multipurpose Indian vegetable. **Journal of Economic Botany**, v.34(3) p. 276-283, 1980.

RARATY, M. G.; MURPHY, J. A.; MCLOUGHLIN, E.; SMITH, D.; CRIDDLE, D.; SUTTON, R. Mechanisms of acinar cell injury in acute pancreatitis. **Scand J Sur.**, v. 94, p.89-96, 2005.

RARATY, M.; WARD, J.; ERDEMLI, G.; et al. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cell. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, p. 13126-13131, 2000.

RASHID, U.; ANWAR, F.; MOSER, B. R.; et al. *Moringa oleifera* oil: a possible source of biodiesel. **Bioresour Technol**, v. 99, p. 8175-8179, 2008.

REAVES T. A.; CHIN A. C.; PARKOS C. A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 191-198, 2005.

REDDY S.T.; GILBERTRS; XIE W.; LUNER S.; HERSCHMAN H.R. TGF-beta 1 inhibits both endotoxin-induced prostaglandin synthesis and expression of the TIS10/prostaglandin synthase 2 gene in murine macrophages. **J Leukoc Biol.**, v.55, p. 192-200, 1994.

RENNER, J. G.; SAVAGE, W.T.; PANTOJA, J. L.; Death due to acute pancreatitis: a retrospective analysis of 405 autopsy cases. **Dig Dis Sci**, v. 30, p.1005-18, 1985.

RICHÉ, F.C. et al. Inflammatory cytokines, Creactive protein, and procalcitonin as early predictors of necrosis infection in acute necrotizing pancreatitis. **Surgery**, v.133, n.3, p.257-262, 2003.

ROSA, I.; PAIS, M. J.; FÁTIMA, C.; QUEIROZ, A. Pancreatite aguda: atualização e proposta de protocolo de abordagem. Unidade de Gastroenterologia do Hospital do Espírito Santo. Évora. **Acta Méd Port.**, v. 17, p. 317-324, 2004.

ROSS, D.; Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. **Pharmacol Therapeut**, v. 37, p. 231, 1988.

ROTH, J. Lectins for histochemical demonstration of glycans. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 136, p. 117–130, 2011.

RUCKMANI, K.; et al. Effect of *Moringa oleifera* Lam on paracetamol-induced hepatotoxicity. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 33-35, 1998.

RUDIGER, H.; GABIUS HANS-J. Plant Lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, v. 15, n. 3, p. 589-613, 2001.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **J Pharmacol**, v. 115, p. 1265-1275, 1995.

SALUJA, A. K.; BHAGAT, L.; LEE, H. S.; BHATIA, M.; FROSSARD, J. L.; STEER, M. L. Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. **Am J Physiol**, v. 276, p.G835–G842, 1999.

SALUJA, A. K.; BHAGAT, L.; LEE, H. S.; et al. Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. **Am J Physiol**, v. 276, p. 835-842, 1999.

SALUJA, A. K.; DONAVAN, E. A.; YAMANAKA, K.; YAMAGUCHI, Y.; HOFBAUER, B. Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin. **Gastroenterology**, v. 113, p. 304-310, 1997.

SALUJA, A. K.; LERCH, M. M.; PHILLIPS, P. A.; DUDEJA, V. Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis? **Annu Rev Physiol**, v. 69, p. 249–269, 2007.

SÁNCHEZ-BERNAL, C. et al. Nitric oxide protects against pancreatic subcellular damage in acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 28, n. 1, p. e9–e15, 2004.

SÁNCHEZ-MACHADO; D.I.; NÚÑEZ-GASTÉLUM; J. A.; REYES-MORENO; C.; RAMÍREZ-WONG; LÓPEZ-CERVANTES. Nutritional Quality of Edible Parts of *Moringa oleifera*, Food Anal. **Methods**, n. 3, 2010.

SANDOVAL, D. et al. The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 111, n. 4, p. 1081–1091, 1996.

SANTOS, R. M. S.; SANTOS, M. F.; COSTA, M. F. D. Quimioluminescência e bioluminescência. **Quim Nova**, v. 16, p. 200-2019, 1993.

SATHYANARAYAN, G. et al. Elevated level of interleukin-6 predicts organ failure and severe disease in patients with acute pancreatitis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, n. 4, p. 550–554, abr. 2007.

SCARPELLI, D.G. The pancreas. (2nd.) JB Lippincott Company, p. 777-794. 1994.

SCHULZ HU1, NIEDERAU C, KLONOWSKI-STUMPE H, HALANGK W, LUTHEN R, LIPPERT H. Oxidative stress in acute pancreatitis. **Hepatogastroenterology**, v. 46, p. 2736-50, 1999.

SCHÜTTE, K.; MALFERTHEINER, P. Markers for predicting severity and progression of acute pancreatitis. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 75–90, 2008.

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.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SELVATICI R.; FALZARANO S.; MOLLICA A.; SPISANI S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. **Eur J Pharmacol**, v.534, n. 1-3, p. 1-11, 2006.

SENDER, M.; DUMMER, A.; WEISS, F. U.; KRÜGER, B.; WARTMANN, T.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K.; VAN ROOIJEN, N.; MALLA, S. R.; AGHDASSI, A.; HALANGK, W.; LERCH, M. M.; MAYERLE, J. Tumour necrosis factor secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. **Gut**, v.62, p. 430-439, 2012.

SEROU M.J.; DECOSTER M.A.; BAZAN N.G. Interleukin-1 beta activates expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in primary hippocampal neuronal culture: platelet-activating factor as a preferential mediator of cyclooxygenase-2 expression. **J Neurosci Res**, v.58, p. 593-598, 1999.

SEYHUN E.; MALO A.; SCHAFFER C.; MOSKALUK C.A.; HOFFMANN RT.; GOKE B.; KUBISCH C.H. Tauroursodeoxycholic acid reduces endoplasmic reticulum stress, acinar cell damage, and systemic inflammation in acute pancreatitis. **Am J Physiol Gastrointest**, v.301, p.773-82, 2011.

SHARON, N. Lectins-carbohydrates complexes of plants and animals. **Na atomic. Trends Biochemical Science**, v. 18, p. 221-6. 1993.

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

SHIBA H.; ZHU X.; ARAKAWA Y.; IREFIN S.; WANG B.; TRENTI L.; FUNG J.J.; SILVA, A. R.; KERR, W. E. Moringa: uma nova hortaliça para o Brasil. Uberlândia: UFU/DIRIU, p.95, 1999.

SINGH, A. P.; JUNEMANN, A.; MUTHURAMAN, A; JAGGI, A. S. SINGH, N.; GROVER, K.; DHAWAN, R. Animal models of acute renal failure. **Pharmacol Rep**, v. 64, p.31-44, 2012.

SINHA M.; DAS D.K.; BHATTACHARJEE S.; MAJUMDAR S.; DEY S. Leaf extract of Moringa oleifera prevents ionizing radiation-induced oxidative stress in mice. **J Med Food**, v. 14, n. 10, p. 1167-72, 2011.

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.

SONG, A.M.; BHAGAT, L.; SINGH, V. P.; VAN ACKER, G.S.; STEER, M.L.; SALUJA, A.K. Inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.283, p.1166-1174, 2002.

SONG, A.M.; BHAGAT, L.; SINGH, V.P.; VAN ACKER, G.S.; STEER, M.L.; SALUJA, A.K. Inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 283, p. 1166-1174, 2002.

SOUSA, A. A.; BENEVIDES, N. M.; DE FREITAS, P. A.; FIÚZA, F. P, QUEIROZ, M. G.; MORAIS, T. M.; PEREIRA, M. G.; ASSREUY, A. M. A report of a galactan from marine alga *Gelidium crinale* with in vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 27(2), p. 173-180, 2013.

SOUSA, B. L.; SILVA-FILHO, J. C.; KUMAR, P.; GRAEWERT, M. A.; PEREIRA, R. I.; CUNHA, R. M.; NASCIMENTO, K. S.; BEZERRA, G. A.; DELATORRE, P.; DJINOVIC-CARUGO, K.; NAGANO, C. S.; GRUBER, K.; CAVADA, B. S. Structural characterization of a *Vatairea macrocarpa* lectin in complex with a tumor – associated antigen: A new tool for câncer research. **Int J Biochem. Cell Biol**, v. 72, p. 27-39, 2016.

SOWJANYA, J.; SANDHYA, T.; VEERESH, B. Ameliorating Effect of Eugenol on L-arginine Induced Acute Pancreatitis and Associated Pulmonary Complications in Rats. **Pharmacologia**, v. 3, n. 12, p. 657–664, 2012.

STEINLE, A.U.; WEIDENBACH, H.; WAGNER, M.; ADLER, G.; SCHMID, R.M.;

SUGIURA, H.; ICHINOSE, M. Nitrate stress in inflammatory lung diseases. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 2, p. 138–144, ago. 2011.

SZABOLCS, A.; REITER, R.J.; LETOHA, T.; HEGYI, P.; PAPAI, G.; VARGA, I.; JARMAY, K.; KASZAKI, J.; SARI, R.; LONOVICS, J.; TAKACS, T. Effect of melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats. **World J Gastroenterol.**, v. 812, p. 251-258, 2006.

SZECOWKA, J.; HALLDEN, G.; GOLDFINE, WILLIAMS, J. A. Purification of the pancreatic cholecystokinin receptor. **Reg Pept**, v. 24, p. 215-224, 1989.

TAKÁCS, T. et al. The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine-induced acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 25, n. 3, p. 277–282, 2002.

TANAKA, K; ITO, M; KODAMA, M; TOMITA, M; KIMURA, S; HOYANO, M; MITSUMA, W; HIRONO, S; HANAWA, H; AIZAWA, Y. Sulfated polysaccharide fucoidan ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**, v. 16(1),p. 79-86, 2011.

TASIC T.; GRGOV S.; NAGORNI A.; BENEDETO-STOJANOV D. Comparison of biohumoral and morphological parameters in acute pancreatitis. **Srp Arh Celok Lek**, v.142, p.29–33, 2014.

TEIXEIRA, C.S.; ASSREUY, A.M.S.; OSTERNE, V.J.S; AMORIM, R.M.F.; BRIZENO, L.A.C.; DEBRAY, H.; NAGANO, C.S.; DELATORRE, P.; SAMPAIO, A.H.; ROCHA, B.A.M.; et al. Mannose-specific legume lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (FRIL) stimulates inflammatory and hypernociceptive processes in mice. **Process Biochem**, v. 49, n. 3, p. 529-534, 2014.

TEIXEIRA, E.H.; et al. In vitro inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 111-116, 2006.

TELEK, G.; REGOLY-MEREI, J.; KOVACS, G. C.; SIMON, L.; NAGY, Z.; HAMAR, J.; JAKAB, F. The first histological demonstration of pancreatic oxidative stress in human acute pancreatitis. **Hepatogastroenterology**, v. 48, p. 1252-1258, 2001.

TENNER, S. et al. American College of Gastroenterology guideline: management of acute pancreatitis. **The American journal of gastroenterology**, v. 108, n. 9, p.1400–1415; 1416, 2013.

TIMOSHENKO, A. V.; CHERENKEVICH, S. N.; GABIUS, H. J. *Viscum album* agglutinin-induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function. **Biomed Pharmacother**, v. 49(3), p. 153-158, 1995.

TIMOSHENKO, A. V.; GABIUS, H. J. Efficient induction of superoxide release from human neutrophils by the galactoside-specific lectin from *viscum album*. **Biol. Chem Hoppe Seyler**, v. 374(4), p. 237-243, 1993.

TRINDADE, M. B.; et al. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 146-152, 2006.

TSUJI N.; WATANABE N.; OKAMOTO T.; NIITSU Y. Specific interaction of pancreatic elastase and leucocytes to produce oxygen radicals and its implication in pancreatitis. **Gut**, v.35, n.11, p. 1659-64, 1994.

VAN, L. J. L.; MARCHANT, A.; DELVAUX, A.; et al. Interleukin 10 prevents necrosis in murine experimental acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v.108, p; 1917-1922, 1995.

VAN DAMME, E. J. M.; et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological role. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 575–692, 1998.

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.

VORONINA, S.; COLLIER, D.; CHVANOV, M.; MIDDLEHURST, B.; BECKETT, A.J.; PRIOR, I.A.; CRIDDLE, D.N.; BEGG, M.; MIKOSHIBA, K.; SUTTON, R.; TEPIKIN, A.V. The role of Ca²⁺ influx in endocytic vacuole formation in pancreatic acinar cells. **BIOCHEM J.**, v.465, n.3, p. 405-12, 2015.

WANG, H.; LUO, W.; WANG, J.; GUO, C.; WANG, X.; WOLFFE, S.L.; BODARY, P.F.; EITZMAN, D.T. Obesity-induced endothelial dysfunction is prevented by deficiency of P-selectin glycoprotein ligand-1. **Diabetes**, v. 61(12), p. 3219-27, 2012.

WASLE, B.; EDWARDSON, J.M.; The regulation of exocytosis in the pancreatic acinar cell. **Cell Signal**, v. 14 (3), p.191-197, 2002.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel by simple sugars. **Nature**, v. 169, n. 4307, p. 825–826, 1952.

WEIDENBACH, H.; LERCH, M.M.; GRESS, T.M.; PFAFF, D, TURI, S.; ADLER, G. Vasoactive mediators and the progression from oedematous to necrotizing experimental acute pancreatitis. **Gut**, v. 37, p. 434-440, 1995.

WEN, L.; VORONINA, S.; JAVED, M. A.; et al. Inhibitors of orai1 prevent cytosolic calcium-associated injury of human pancreatic acinar cells and acute pancreatitis in 3 mouse models. **Gastroenterology**, v. 149, p. 481-492, 2015.

WERESZCZYNSKA-SIEMIATKOWSKA, U. et al. Serum profiles of interleukin-18 indifferent severity forms of human acute pancreatitis. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.37, n.9, p.1097-1102, 2002.

WILLIAMS, J. A. Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. **Annu Rev Physiol.**, v.63, p. 77-97, 2001.

WONG J. H.; NG T. B.; CHEUNG, R. C.; YE, X. J.; WANG, H. X.; LAM, S. K.; LIN, P.; CHAN, Y. S.; FANG, E. F.; NGAI, P. H.; XIA, L. X.; YE, X. Y.; JIANG, Y.; LIU, F. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1221–1235, 2010.

XAVIER FILHO, J. ; PEREIRA, M. L. ; ROCHA-BEZERRA, L. C. B. ; BRILHANTE, R. S. N. ; MORENO, F. B. M. B. ; MOREIRA, A. C. M. ; COSTA, H. P. S. ; LOPES, T. D. P. ; OLIVEIRA, J. T. A. ; VASCONCELOS, ILKA M. Mo-CBP2, a Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Seeds, Presents Anticandidal Activity by Increasing Cell Membrane Permeability and ROS Production. In: XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Natal. CD-ROM, v. 34, 2016.

XIAO W.Q.; YIN G.J.; FAN Y.T.; QIU L.; CANG X.F.; YU G.; HU Y.L.; XING M.; WU DE Q.; WANG X.P.; H.U GY.; WAN R. Catalpol ameliorates sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in rats via inhibiting activation of nuclear factor kappa B. **Int J Mol Sci.**, v.15, p. 11957-72, 2014.

XIAO, X.; FISCHBACH, S.; FUSCO, J.; ZIMMERMAN, R.; SONG, Z.; NEBRES, P.; RICKS, D. M.; PRASADAN, K.; SHIOTA, C.; HUSAIN, S. Z.; HUSAIN, S. Z.; GITTES, G.K. PNA lectin for purifying mouse acinar cells from the inflamed pancreas. **Sci Rep**, v. 17, p. 6, 2016.

YADAV D.; AGARWAL N.;PITCHUMONI C.S. A critical evaluation of laboratory tests in acute pancreatitis. **Am J Gastroenterol.**, v.97, p.13091–8, 2002.

YANG, F.; XIE, J.; WANG, W.; XIE, Y.; SUN, H.; JIN, Y.; XU, D.; CHEN, B.; ANDERSSON, R.; ZHOUM M. Regional arterial infusion with lipoxin a4 attenuates experimental severe acute pancreatitis. **Plos One**, v. 29, p. 9, 2014.

YAO W.Y.; ZHOU Y.F.; QIAN A.H.; ZHANG Y.P.; QIAO M.M.; ZHAI Z.K.; YUAN Y.Z.; YANG S.L. Emodin has a protective effect in cases of severe acute pancreatitis via inhibition of nuclear factor-kB activation resulting in antioxidation. **Mol Med Rep**,v.11, n.2, p.1416-20, 2015.

YU J.H.; KIM H. Oxidative stress and inflammatory signaling in cerulein pancreatitis. **World J Gastroenterol**, v. 20, p. 17324-9, 2014.

YU, G.; WAN, R.; YIN, G.; XIONG, J.; HU, Y.; XING, M.; CANG, X.; FAN, Y.; XIAO, W.; QIU, L.; WANG, X.; HU, G. Diosmetin ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis in mice by inhibiting the activation of the nuclear factor-Kb. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, p. 2133-2142, 2014.

YU, Q. J.; LI, Z. Y.; YAO, S.; MING,; WANG,; S. Y; LIU, B.; et al. In silico analysis of molecular mechanisms of galanthus nivalis agglutinin-related lectin-induced cancer cell death from carbohydrate-binding motif evolution hypothesis. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 165, p. 1037- 1046, 2011.

ZHANG, X.W; LIU, Q; THORLACIUS, H. Inhibition of selectin function and leukocyte rolling protects against dextran sodium sulfate-induced murine colitis. **Scand J Gastroenterol**, v. 36(3), p. 270-5, 2001.

ZHANG, H. et al. IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 3, p. 1019–1031, 2013.

Zhang, N. et al. Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 247–259, 2005.

ZHANG, X.P.; ZHANG, L.; YANG, P.; ZHANG, R.P.; CHENG, Q.H. Protective effects of baicalin and octreotide on multiple organ injury in severe acute pancreatitis. **Dig Dis Sci**, v.53, p.581-91, 2008.

ZHANG, Y. P.; QIAO, M. M.; ZHAI, Z. K.; YUAN, Y. Z.; YANG, S. L. Emodin has a protective effect in cases of severe acute pancreatitis via inhibition of nuclear factor- κ B activation resulting in antioxidation. **Mol Med Rep**. v. 11, p. 1416-1420, 2015.