



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

**RENATA LINE DA CONCEIÇÃO RIVANOR**

**LECTINA DA ALGA *Caulerpa cupressoides*: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL,  
EFICÁCIA E POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPERNOCICEPCÃO  
INFLAMATÓRIA DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

**FORTALEZA**

**2017**

RENATA LINE DA CONCEIÇÃO RIVANOR

LECTINA DA ALGA *Caulerpa cupressoides*: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL, EFICÁCIA  
E POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPERNOCICEPCÃO  
INFLAMATÓRIA DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Maria Barros Benevides.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hellíada Vasconcelos Chaves.

FORTALEZA

2017

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)

---

- R5151 Rivanor, Renata Line da Conceição.  
Lectina da alga *Caulerpa cymatoceras* : caracterização parcial, eficácia e possíveis mecanismos envolvidos na hipernocicepção inflamatória da articulação temporomandibular de ratos / Renata Line da Conceição Rivanor. – 2017.  
119 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.  
Coorientação: Profa. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves.
1. Biomoléculas. 2. Inflamação. 3. Nocicepção. I. Título.

CDD 600

---

RENATA LINE DA CONCEIÇÃO RIVANOR

LECTINA DA ALGA *Caulerpa cupressoides*: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL, EFICÁCIA  
E POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPERNOCICEPÇÃO  
INFLAMATÓRIA DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 21/12/2017

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirna Marques Bezerra  
Universidade Federal do Ceará (UFC)- *Campus* Sobral

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karuza Maria Alves Pereira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Natássia Albuquerque Ribeiro  
Faculdades Nordeste-Fanor/Devry

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alana de Freitas Pires  
Centro Universitário Estácio do Ceará (Estácio FIC)

À minha família, em especial minha mãe  
Delma.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup> Norma Maria Barros Benevides por ter me recebido de braços abertos em seu Laboratório, pela orientação, suporte e incentivo nos momentos difíceis.

À Prof<sup>ª</sup>. Hellíada Vasconcelos Chaves por ter aceitado me coorientar, por ter aberto as portas do seu laboratório e da sua casa em Sobral, pelo companherismo, gentileza, apoio e ensinamentos dados ao longo do doutorado.

À Prof<sup>ª</sup>. Mirna Marques Bezerra, pela hospitalidade e atenção durante o período que estive no Laboratório de Farmacologia - Campus Sobral/UFC e pela gentileza de integrar a banca examinadora deste trabalho.

Às Professoras Natássia Ribeiro Albuquerque, Karuza Maria Alves Pereira e Alana Pires, por, gentilmente, integrarem a banca examinadora deste trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Gerly Anne e aos alunos Deiziane Viana e Álvaro Franco pela a realização das análises por Western Blotting.

À técnica Nayara de Sousa por seu apoio e pela disposição em ajudar.

Ao Prof. Eduardo Sousa, por ter cedido o seu laboratório para a realização dos experimentos de dicroísmo circular. E, especialmente, ao Wellinson Gadelha e Acrísio Bastos por terem me ajudado na realização dessas análises. Muito obrigada!

Ao Prof. José Tadeu, por sua enorme contribuição na correção do artigo fruto desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia do Campus Sobral/UFC, em especial, a Danielle Val, Lorena Vasconcelos, Felipe Dantas, Ellen, Sebastião, Trycia pela imensa ajuda nos experimentos ao longo do doutorado. Sem o auxílio de vocês não teria conseguido. MUITÍSSIMO obrigada!

A todos os amigos do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (Carbolec), que me ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho: Acrísio Bastos, George Meredite, Valdécio Silvano, Pedro Nonato, Cirlânio, Edna, Ingrid, Carol Dantas, Ewerton, Lucas, Márjory Holanda, Helayne, Annyta Frota e Vitória Virgínia!

Em especial, agradeço ao meu amigo e companheiro de doutorado Neto Silva e a Ticiane Lima e Ticiane Abreu, pelos conselhos, pelo apoio, pela companhia, pelos almoços compartilhados e pela amizade construída! Obrigada por tudo!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, por terem contribuído para a minha formação profissional e pessoal.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, principalmente, da minha turma de doutorado.

Aos meus queridos amigos de hoje e de sempre, Kaira Emanuella pelo o apoio incondicional, Luciana Bastos, Tuelly Bandeira, Daniele Holanda, Priscila Azevedo, Tarcila Emanoela, Eder Lopes, que sempre estiveram comigo, mesmo em caminhos diferentes, trazendo carinho, alegria e conforto. Vocês são presentes de Deus em minha vida!

Aos “anjos” que Deus colocou na minha vida, Mirtes Ferreira, Elizete Lopes e Edvan Lopes, por todo apoio e pela confiança depositada em mim. Serei eternamente grata a vocês!

Ao meu amor, Guilherme Teixeira, por estar sempre ao meu lado me incetivando e apoiando, pela sua compreensão, paciência e amor.

À minha família, pelo carinho, admiração e por acreditar sempre em mim, em especial à minha Mãe, que é sempre uma fonte inesgotável de estímulo e incentivo, que com muito orgulho levanta minha bandeira e me dar forças para prosseguir. Ela é minha maior fã. Obrigada pelo amor incondicional, paciência e confiança. Perdoe-me por não estar sempre presente. A senhora e meu irmão são essenciais, meu tudo, minha vida. Amo Vocês!

À Deus, que possibilita tudo, que me deu a vida e a capacidade de realizar meus objetivos, abençoando sempre a minha caminhada.

À Universidade Federal do Ceará (UFC); ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo o apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio e custeio de projetos desenvolvidos no Carbolec e ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo custeio de projetos realizados no Carbolec.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Peçam e receberão; procurem e acharão; batam e a porta se abrirá. Porque todos aqueles que pedem recebem; aqueles que procuram acham; e a porta se abre para quem bate... Vocês, mesmo sendo maus, sabem dar coisas boas aos seus filhos. Quanto mais o Pai que está no céu dará coisas boas aos que lhe pedirem.”

(Mateus 7:1)

## RESUMO

As algas marinhas são fontes de lectinas, proteínas que se ligam especificamente e de forma reversível a mono ou oligossacarídeos, o que faz das lectinas ferramentas valiosas em muitos processos farmacológicos e biotecnológicos, incluindo o controle da dor e inflamação. As disfunções temporomandibulares (DTM), por sua vez, são a segunda maior causa de dor orofacial, comumente associada à dor crônica. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar parcialmente a estrutura da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (LCc), investigando sua eficácia e possíveis mecanismos na hipernocicepção inflamatória da articulação temporomandibular de ratos. LCc foi, então, extraída com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e isolada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. Posteriormente, foi caracterizada por espectroscopia de dicroísmo circular (DC). Para avaliação da hipernocicepção inflamatória, ratos *Wistar* machos receberam LCc ou salina estéril, 30 min antes da injeção intra-articular da Formalina (1,5%/50  $\mu$ L), Serotonina (5-HT) (225  $\mu$ g/50  $\mu$ L), Capsaicina (1,5%/20  $\mu$ L) ou Carragenana (100  $\mu$ g/25  $\mu$ L + 5-HT 75  $\mu$ g/25  $\mu$ L) na ATM esquerda. Grupos controles receberam salina estéril (50  $\mu$ L; i.art.), indometacina (5 mg/kg; s.c) ou morfina (5 mg/kg, s.c.). O comportamento nociceptivo foi avaliado por 45min, para a Formalina, e por 30min, para 5-HT, Capsaicina e Carragenana + 5-HT. Os tecidos periarticulares foram removidos para determinação dos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) por ELISA, de proteínas ICAM-1, CD55 e COX-2 por Western Blotting e a permeabilidade vascular. Para investigar o mecanismo de ação, os animais foram pré-tratados com os antagonistas seletivos dos receptores canabinoides AM281 ou AM630 (3 mg/kg; i.p.), naloxona (antagonista dos receptores opioides, 15  $\mu$ g/10  $\mu$ L), aminoguanidina, ODQ, KT5823, glibenclamida e ZnPP-IX (antagonistas das vias NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> e HO-1), antes da administração de LCc (10 mg/kg). O comprometimento da atividade motora foi avaliado pelo teste rota rod. Como resultados, a análise por DC revelou que a LCc é composta, predominantemente, por folhas- $\beta$ . O pré-tratamento com LCc (0,1; 1 ou 10 mg/kg) promoveu a redução ( $p < 0,05$ ) da hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina em 63,5; 82 e 90%, respectivamente. Reduziu o extravasamento plasmático, os níveis TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1 e COX-2 no tecido periarticular quando comparado ao grupo Formalina ( $p < 0,05$ ). LCc (10 mg/kg) foi capaz reduzir ( $p < 0,05$ ) o comportamento nociceptivo induzido Capsaicina, sugerindo que LCc tem um efeito direto nas fibras C-nociceptivas. LCc também reduziu ( $p < 0,05$ ) a hipernocicepção inflamatória induzida por Carragenana e 5-HT, confirmando o seu efeito anti-inflamatório. Além disso, os efeitos de LCc não dependem do

sistema canabinoide e opioide, da via da HO-1 e NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>. Ademais, a LCc não alterou a coordenação motora dos animais no teste de rota rod. Portanto, LCc apresentou efeito antinociceptivo e anti-inflamatório sobre a hipernocicepção inflamatória na ATM, reduzindo a produção de citocinas primárias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), molécula de adesão ICAM-1 e COX-2.

**Palavras-chave:** Biomoléculas. Inflamação. Nocicepção.

## ABSTRACT

Marine algae are sources of lectins, proteins that bind specifically and reversibly to mono- or oligosaccharides, making lectins valuable tools in many pharmacological and biotechnological processes, including pain control and inflammation. Temporomandibular disorders (TMD), in turn, are the second major cause of orofacial pain, commonly associated with chronic pain. Thus, the aim of this study was to partially characterize the lectin structure of the green seaweed *Caulerpa cupressoides* (CcL), investigating its efficacy and possible mechanisms in the inflammatory hypernociception of the temporomandibular joint of rats. The CcL was, then, isolated by extraction with Tris-HCl buffer 25 mM (pH 7.5), and isolated by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose column. Subsequently, was characterized by circular dichroism (CD) spectroscopy. For the evaluation of inflammatory hypernociception, male *Wistar* rats received CcL or sterile saline, 30min before the intra-articular (i.art.) injection of Formalin (1.5%/50 uL), Serotonin (5-HT) (225 ug/50 uL), Capsaicin (1.5%/ 20 uL) or Carrageenan (100 µg/25 uL + 5-HT 75 µg/25 uL) into the left TMJ. Control groups received saline (50 µL; i.art.), indomethacin (5 mg/kg, s.c.) or morphine (5 mg/kg, s.c.). Nociceptive behavior was quantified for 45min, for the formalin group, and for 30min for 5-HT, Capsaicin and Carregenana + 5-HT groups. The periarticular tissue was excised to determining cytokine levels (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) by ELISA, protein determination of ICAM-1, CD55 and COX-2 by Western Blotting and the vascular permeability. To investigate the mechanism of action, the animals were pretreated with selective cannabinoid receptor antagonists AM281 or AM630 (3 mg/kg; ip), naloxone (opioid receptor antagonist, 15 µg/10 µL), aminoguanidine, ODQ, KT5823, glibenclamide and ZnPP-IX (NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> and HO-1 pathways antagonists) prior to administration of CcL (10 mg/kg). The rotarod test evaluated the animal motor impairment. As result, the CD analysis revealed that the CcL is composed, predominantly, by  $\beta$ -sheet. Pretreatment with CcL (0. 1; 1 or 10 mg/kg) promoted a reduction (p<0.05) of inflammatory hypernociception induced by formalin in 63.5; 82 and 90%. CcL reduced (p<0.05) the plasma extravasation, levels TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1 and COX-2 in the periarticular tissue when compared to the formalin group (p<0.05). CcL (10 mg / kg) was able to reduce (p<0.05) nociceptive behavior induced Capsaicin, suggesting that CcL has a direct effect on C-nociceptive fibers. CcL also reduced (p<0.05) the inflammatory hypernociception induced by Carrageenan and 5-HT, confirming its anti-inflammatory effect. In addition, the effects of CcL do not depend on the cannabinoid and opioid system, the HO-1 and NO/cGMP/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> pathway. In addition, the CcL did

not alter the motor coordination of the animals in the rotarod test. Therefore, CcL presented antinociceptive and anti-inflammatory effects on inflammatory hypernociception in TMJ, reducing the production of primary cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ), adhesion molecule ICAM-1 and COX-2.

**Keywords:** Biomolecule. Inflammation. Nociception.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Anatomia do complexo trigeminal no tronco encefálico.....	24
Figura 2 –	Migração dos leucócitos da corrente sanguínea para o tecido lesado.....	25
Figura 3 –	Participação de células e de mediadores inflamatórios na dor orofacial.....	26
Figura 4 –	Classificação estrutural das lectinas.....	38
Figura 5 –	Representação esquemática da interação lectina-carboidratos: (A) tecido qualquer e (B) eritrócitos.....	39
Figura 6 –	Classificação taxonômica da alga marinha verde <i>Caulerpa cupressoides</i> .....	46
Figura 7 –	Esquema de extração e purificação da lectina da alga marinha verde <i>C. cupressoides</i> (LCc).....	49
Figura 8 –	Espectro da estrutura secundária da LCc em condições nativas.....	62
Figura 9 –	Efeito da temperatura sobre a estrutura secundária da LCc.....	63
Figura 10 –	Espectro da estrutura secundária da LCc em condições nativas e após o aquecimento.....	64
Figura 11 –	Eficácia da LCc no comportamento nociceptivo induzido por Formalina na ATM de ratos.....	67
Figura 12 –	Avaliação da eficácia da LCc na permeabilidade vascular sobre a hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina.....	67
Figura 13 –	Efeito da LCc associado à mucina na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina.....	70
Figura 14 –	Participação de grânulos mastocitários no efeito anti-inflamatório da LCc.....	70
Figura 15 –	Efeito da LCc nos níveis de TNF- $\alpha$ (A) e IL-1 $\beta$ (B) no tecido periarticular.	73
Figura 16 –	Efeito da LCc nos níveis de ICAM-I (A) e CD55 (B) no tecido periarticular	76
Figura 17 –	Efeito da LCc nos níveis de COX-2 no tecido periarticular.....	78
Figura 18 –	Eficácia da LCc na inflamação induzida por Carragenana na ATM de ratos.	80
Figura 19 –	Efeito da LCc nos níveis de COX-2 na hipernocicepção inflamatória induzida por Carragenana.....	81
Figura 20 –	Eficácia da LCc na hipernocicepção inflamatória induzida por Serotonina na ATM de ratos.....	82

Figura 21-	Eficácia da LCc no comportamento nociceptivo induzido por Capsaicina na ATM de ratos.....	84
Figura 22-	Avaliação do envolvimento da via dos canabinoides no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da LCc.....	86
Figura 23-	Participação da via NO/GMPc/PKG/K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub> dependente no efeito antinociceptivo da LCc.....	88
Figura 24-	Envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo da LCc.....	90
Figura 25-	Envolvimento da via HO-1 no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da LCc.....	92
Figura 26-	Efeito da LCc no teste do rota rod.....	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Elementos de estrutura secundária da Lectina da <i>C. cupressoides</i> .....	64
-----------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEL	<i>Abelmoschus esculentus</i>
AINEs	Anti-inflamatórios Não-esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ATM	Articulação Temporomandibular
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina Séria Bovina
BVD	Biliverdina
CB1	Receptor Canabinoide do Tipo 1
CB2	Receptor Canabinoide do Tipo 2
CD	Dicroísmo Circular
CD 55	Fator de Decaimento de Aceleração
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CO	Monóxido de Carbono
COX	Cicloxigenase
DEAE	Dietilaminoetil
DMSO	Dimetilsufóxido
DTM	Disfunção Temporomandibular
EDTA	Ácido Etilenoaminotetracético
EP	Receptores Prostanóides E
E.P.M.	Erro Padrão da Média
FTL	Frutalina
GAGs	Glicosaminoglicanos
GC	Guanilil Ciclase
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	receptores de membrana ligados à proteína G
H1	Receptor de Histamina 1
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
HO-1	Hemeoxigenase-1

IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL	Interleucina
IL- 1 $\beta$	Interleucina 1-beta
i.art.	Intra-articular
ICAM-1	Molécula De Adesão Intercelular-1
i.p.	Intraperitonal
i.v.	Intravenosa
kDa	Quilodáltons
LCc	Lectina de <i>Caulerpa cupressoides</i>
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
MAPK	Proteíno-quinases ativadas por mitógenos
MMP	Metaloproteinases de Matriz
MPO	Mieloperoxidase
NF- $\kappa$ B	Fator de Transcrição Nuclear kappa B
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOSi	Óxido Nítrico Sintase induzida
PAF	Fator de Ativação Plaquetar
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PBS	Tampão Fosfato
PI3K $\gamma$	Fosfoinosítídeo 3-quinase $\gamma$
PG	Prostaglandina
PG1	Prostaglandina 1
PG2	Prostaglandina 2
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PKG	Proteína quinase G
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial Hidrogeniônico
s.c.	Subcutânea
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SBC	Sociedade Brasileira de Cefaleia
SNC	Sistema Nervoso Central
TB	Tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5
TENS	Estimulação Elétrica Neural Transcutânea
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRPV1	Receptor Vanilóide De Potencial Transitório 1
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório relacionado a proteína Anquirina 1
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular-1
UH	Unidades de Hemaglutinação
UFC	Universidade Federal do Ceará
ZnPP IX	Zinco Protoporfirina IX
Zy	Zymosan
5-HT	Serotonina ou 5-hidroxitriptamina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1</b>	<b>Dor Orofacial</b> .....	22
<b>1.2</b>	<b>Dor Inflamatória</b> .....	24
<b>1.3</b>	<b>Disfunção Temporomandibular</b> .....	27
<b>1.4</b>	<b>Mediadores Envolvidos na Hipernocicepção Inflamatória da ATM</b> .....	29
<b>1.5</b>	<b>Fármacos Utilizados no Tratamento das Disfunções Temporomandibulares</b>	33
<b>1.6</b>	<b>Algas Marinhas</b> .....	36
<b>1.6.1</b>	<b><i>Lectinas</i></b> .....	37
<b>1.6.1.1</b>	<b><i>Lectinas de Algas Marinhas</i></b> .....	39
<b>1.6.1.2</b>	<b><i>Aplicações e Atividades Biológicas de Lectinas de Algas Marinhas</i></b> .....	41
<b>1.6.1.3</b>	<b><i>Lectina da Alga Marinha Verde <i>Caulerpa cupressoides</i></i></b> .....	43
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	45
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	45
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	45
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	46
<b>3.1</b>	<b>Materiais</b> .....	46
<b>3.1.1</b>	<b><i>Alga Marinha</i></b> .....	46
<b>3.1.2</b>	<b><i>Animais</i></b> .....	46
<b>3.1.3</b>	<b><i>Células Sanguíneas</i></b> .....	47
<b>3.1.4</b>	<b><i>Soluções, Drogas e Reagentes</i></b> .....	47
<b>3.2</b>	<b>Métodos</b> .....	48
<b>3.2.1</b>	<b><i>Isolamento e Caracterização Parcial da Lectina da Alga Marinha Verde <i>C. cupressoides</i></i></b> .....	48
<b>3.2.1.1</b>	<b><i>Extração e Purificação da Lectina</i></b> .....	48
<b>3.2.1.2</b>	<b><i>Determinação da Atividade Hemaglutinante</i></b> .....	49
<b>3.2.1.3</b>	<b><i>Espectro de Dicroísmo Circular (CD)</i></b> .....	49
<b>3.2.2</b>	<b><i>Investigação da Eficácia da LCc sobre a Hipernocicepção Inflamatória na ATM de Ratos</i></b> .....	50
<b>3.2.3</b>	<b><i>Desenho Experimental</i></b> .....	50
<b>3.2.4</b>	<b><i>Injeções Intra-articulares</i></b> .....	51
<b>3.2.5</b>	<b><i>Teste Comportamental</i></b> .....	51

3.2.5.1	<i>Teste Formalina.....</i>	52
3.2.5.2	<i>Análise da Permeabilidade Vascular por Azul de Evans.....</i>	52
3.2.5.3	<i>Participação de Grânulos Mastocitários no Efeito da LCc .....</i>	53
3.2.5.4	<i>Dosagem das Citocinas TNF<math>\alpha</math> e IL-1<math>\beta</math>.....</i>	53
3.2.5.5	<i>Detecção Proteica de ICAM-1, CD55 e COX-2.....</i>	54
3.2.5.5.1	<i>Extração de Proteínas.....</i>	54
3.2.5.5.2	<i>Dosagem de Proteína.....</i>	54
3.2.5.5.3	<i>Western Blotting.....</i>	55
3.2.5.6	<i>Teste da Carragenana.....</i>	55
3.2.5.7	<i>Teste da Serotonina (5-HT).....</i>	56
3.2.5.8	<i>Teste da Capsaicina.....</i>	56
3.2.6	<i>Avaliação do Envolvimento da Via dos Canabinoides.....</i>	57
3.2.7	<i>Análise do Envolvimento da Via Opioide no Efeito Antinociceptivo da LCc.....</i>	57
3.2.8	<i>Avaliação do Envolvimento da Via NO/GMP<sub>c</sub>/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> dependente sobre o Efeito Antinociceptivo da LCc.....</i>	58
3.2.8.1	<i>Grupos Experimentais.....</i>	58
3.2.9	<i>Participação da Via da HO-1.....</i>	59
3.2.10	<i>Determinação do Efeito da LCc na Coordenação Motora de Ratos através do Teste do Rota rod.....</i>	59
3.2.11	<i>Análise Estatística.....</i>	60
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	61
4.1	<b>Espectro de Dicroísmo Circular.....</b>	61
4.2	<b>Eficácia da LCc sobre a Hipernocicepção Inflamatória na ATM de Ratos.....</b>	66
4.2.1	<i>Eficácia da LCc na Hipernocicepção Inflamatória Induzida por Formalina na ATM de Ratos .....</i>	66
4.2.2	<i>Avaliação da Participação de Grânulos Mastocitários no Efeito Anti-inflamatório da LCc .....</i>	71
4.2.3	<i>Avaliação das Dosagens das Citocinas TNF-<math>\alpha</math> e IL-1<math>\beta</math>.....</i>	72
4.2.4	<i>Envolvimento de ICAM-1 e CD55 no Efeito Anti-inflamatório de LCc.....</i>	75
4.2.5	<i>Participação da COX-2 no Efeito Anti-inflamatório de LCc.....</i>	78
4.2.6	<i>Avaliação da Eficácia da LCc na Inflamação Induzida por Carragenana na ATM.....</i>	79
4.2.7	<i>Avaliação da Eficácia da LCc na Hipernocicepção Inflamatória Induzida por</i>	

	<i>Serotonina (5-HT).....</i>	82
4.2.8	<i>Avaliação da Eficácia da LCc na Nociceção Induzida por Capsaicina.....</i>	84
4.2.9	<i>Análise da Participação dos Receptores Canabinoídes CB1 e CB2 nos Efeitos Anti-inflamatório e Antinociceptivo da LCc.....</i>	85
4.2.10	<i>Envolvimento da Via NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> dependente no Efeito Antinociceptivo da LCc.....</i>	87
4.2.11	<i>Avaliação do Envolvimento do Sistema Opióide no Efeito Antinociceptivo da LCc.....</i>	89
4.2.12	<i>Avaliação do Envolvimento da Via da HO-1 nos efeitos Antinociceptivo e Anti-inflamatório da LCc .....</i>	92
4.2.13	<i>Efeito de LCc no Teste do Rota Rod.....</i>	93
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	95
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	96
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	97
	<b>ANEXO.....</b>	118

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dor Orofacial

De acordo com a Associação Internacional para os Estudos da Dor (IASP, 2008), a dor se caracteriza como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos desse dano. A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório e decorre, inicialmente, da sensibilização dos nociceptores, além de estar presente como sintoma de muitas desordens clínicas, que afetam uma grande parcela da população, causando prejuízos à qualidade de vida (VERRI-JUNIOR *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2016).

Por sua vez, a dor orofacial é descrita como condições dolorosas associadas a tecidos moles ou mineralizados da cavidade oral e da face ou descrita como dores referidas a essa região envolvendo estruturas como pele, vasos sanguíneos, ossos, dentes, periodonto, articulações, glândulas, estruturas nervosas, músculos, córnea, meninges, seios da face e mucosa nasal, segundo a Sociedade Brasileira de Cefaleia (SBC, 2010). Envolve um grande grupo de condições como disfunção temporomandibular, cefaleias secundárias, neuropatias, dores odontogênicas e advindas da mucosa oral e dor facial idiopática (NEUBERT *et al.*, 2005; SHINAL; FILLINGIM, 2007). As características comuns de tais condições são a hiperalgesia mecânica primária ou hipersensibilidade no local da lesão e a hiperalgesia mecânica secundária, assim como pode ocorrer alodinia (SHIBUTA *et al.*, 2012).

A dor na região oral ou craniofacial representa um dos maiores problemas de saúde pública, sua presença pode comprometer a qualidade de vida dos pacientes, além de implicar no aumento dos gastos financeiros para os serviços públicos de saúde. Anualmente, só nos Estados Unidos, são gastos mais de US \$100 bilhões no tratamento da dor orofacial e de DTM (SESSLE, 2014; HÆAGGMAN-HENRIKSON *et al.*, 2017)

Vários estudos demonstraram que a dor orofacial possui um alto grau de prevalência na população mundial (GUPTA *et al.*, 2016), atingindo pelo menos 10% da população na fase adulta, sendo que esse risco aumenta para mais de 50% nos idosos (HARGREAVES, 2011).

A percepção da dor na região oral e craniofacial envolve mecanismos periféricos e centrais (RACICH, 2005). A dor é transmitida através de impulsos nociceptivos levados da periferia ao Sistema Nervoso Central (SNC) e para os centros superiores do tronco encefálico (tálamo e córtex somatosensorial), onde é interpretada como tal. No caso da dor orofacial, a

informação nociceptiva é conduzida através das fibras nervosas aferentes primárias (A $\delta$  e C) enviando informações para o complexo nuclear sensorial trigeminal no tronco encefálico (MATTHEWS; SESSLE, 2002). Esse impulso sensitivo é transmitido principalmente por meio do V par de nervos cranianos, o nervo trigêmeo, composto por três ramificações: oftálmica, maxilar e mandibular (GUPTA *et al.*, 2016).

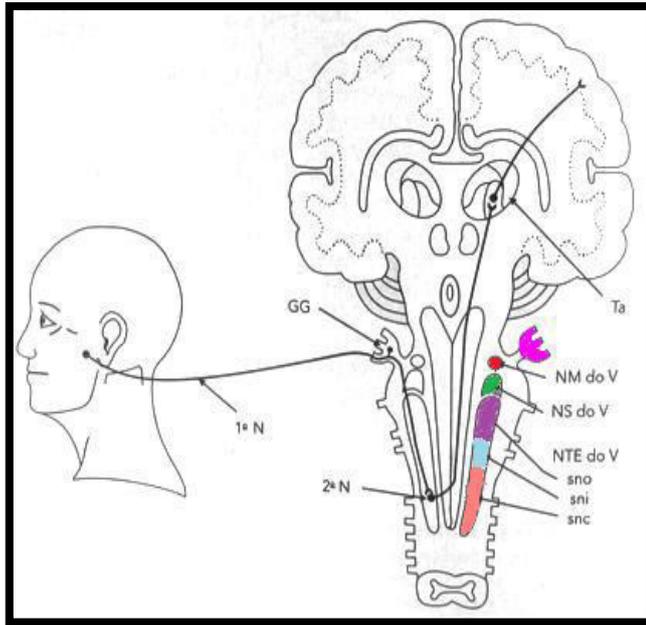
Os corpos celulares dos neurônios aferentes trigeminais estão localizados no gânglio trigeminal, que é estruturalmente semelhante ao gânglio do corno dorsal da medula espinal. Os impulsos transmitidos pelo nervo trigeminal entram diretamente no tronco encefálico na região da ponte fazendo sinapse com os neurônios de segunda ordem no subnúcleo caudal do trato espinal trigeminal (DAVIES *et al.*, 2010; WAITE; ASHWELL, 2004).

O complexo trigeminal do tronco encefálico é dividido anatômica e funcionalmente em núcleo sensorial principal, local de transmissão das sensações de tato e propriocepção; núcleo motor, envolvido nas respostas motoras e, núcleo do trato espinal do trigêmeo, o qual compreende três subnúcleos: oral, interpolar e caudal (**Figura 1**). Este último é o principal sítio de informação nociceptiva do tronco cerebral e, por possuir similaridades com o corno dorsal espinal, é denominado corno dorsal medular (OKESON, 2003; REN; DUBNER, 2011).

A transmissão sináptica se dá por meio da liberação de neurotransmissores estimulatórios, como glutamato e aspartato que atuam nos receptores ionotrópicos NMDA e AMPA, além de outros mediadores, como substância P que agem em receptores das neurocininas, norepinefrina que atuam em receptores alfa-adrenérgicos presentes nos neurônios centrais, trifosfato de adenosina (ATP) que atuam em receptores P<sub>2</sub>X, dentre outros (OKUBO, 2013; MATTHEWS; SESSLE, 2002; OKESON, 2003). Esses neurotransmissores e mediadores modulam a transmissão sináptica via canais iônicos, em especial, canais para sódio (Na<sup>+</sup>), cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>). Esses canais, ao serem ativados, geram correntes que despolarizam ou hiperpolarizam a membrana celular dos neurônios, facilitando ou dificultando a passagem do impulso para as vias ascendentes medulares (LEE; LEE; OH, 2005).

Finalmente, quando a informação nociceptiva chega aos núcleos talâmicos, de onde partem aferências para o córtex somatossensorial e o sistema límbico, a sensação tem um significado sendo percebida como dor (RACICH, 2005; OKESON, 2003).

**Figura 1- Anatomia do complexo trigeminal no tronco encefálico**



**Fonte:** Adaptado de OKESON, 2003.

GG: Gânglio trigeminal, NM do V: núcleo motor do complexo trigeminal, NS do V: núcleo sensitivo principal do complexo trigeminal, NTE do V: núcleo do trato espinal do complexo trigeminal, sno: subnúcleo oral, sni: subnúcleo interpolar, snc: subnúcleo caudal, Ta: tálamo.

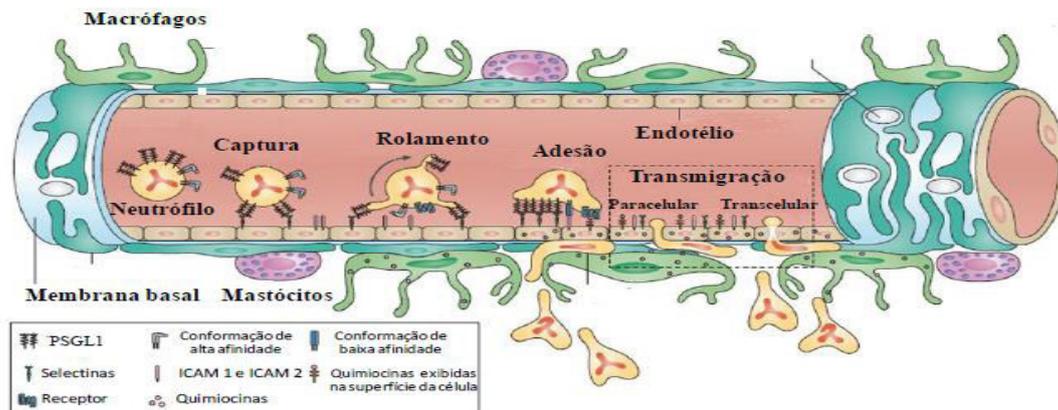
A dor oriunda da ATM pode emanar das estruturas de tecidos moles da articulação ou dos tecidos ósseos, pois, geralmente, as superfícies articulares não são inervadas e, por isso, incapazes de iniciar uma resposta sensitiva. Desta forma, A dor que emana das estruturas ósseas, em geral, ocorre somente após a perda da superfície articular fibrosa da articulação. Quando isto ocorre, é comumente chamada de artrite. As demais dores são denominadas artralguas (dor articular) (DE LEEUW, 2013).

## 1.2 Dor Inflamatória

Uma das vias ascendentes da dor é gerada pelo processo inflamatório, que se caracteriza como uma resposta dos tecidos a estímulos nocivos, tais como injúria, trauma, patógenos, agentes irritantes ou, que provocam alterações na homeostase do tecido e do fluxo sanguíneo (GAESTEL; KOTLYAROV; KRACHT, 2009; SHAILASREE *et al.*, 2012). Este processo envolve uma complexa cascata de eventos vasculares e celulares, que incluem: extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo (LEES *et al.*, 2004).

A migração dos leucócitos, que ocorre em 4 etapas: captura, rolamento, adesão e transmigração/diapedese (**Figura 2**) (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013), envolve um rígido mecanismo de regulação de adesão destas células ao endotélio e subsequente migração transendotelial. Esta interação com o endotélio constitui um processo dinâmico envolvendo a ativação tanto do endotélio quanto dos leucócitos, resultando na liberação de um grande número de moléculas de adesão, incluindo as selectinas (E, P ou L) e integrinas, como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) ou a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), fatores quimiotáticos conhecidos como quimiocinas, óxido nítrico (NO) e receptores de adesão. A interleucina-1(IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) são capazes de ativar as células endoteliais para produzirem selectinas iniciando o processo de adesão, além de, juntamente com as quimiocinas, promoverem o aumento da afinidade com as integrinas (LEY *et al.*, 2007; SHEN *et al.*, 2013).

**Figura 2- Migração dos leucócitos da corrente sanguínea para o tecido lesado**



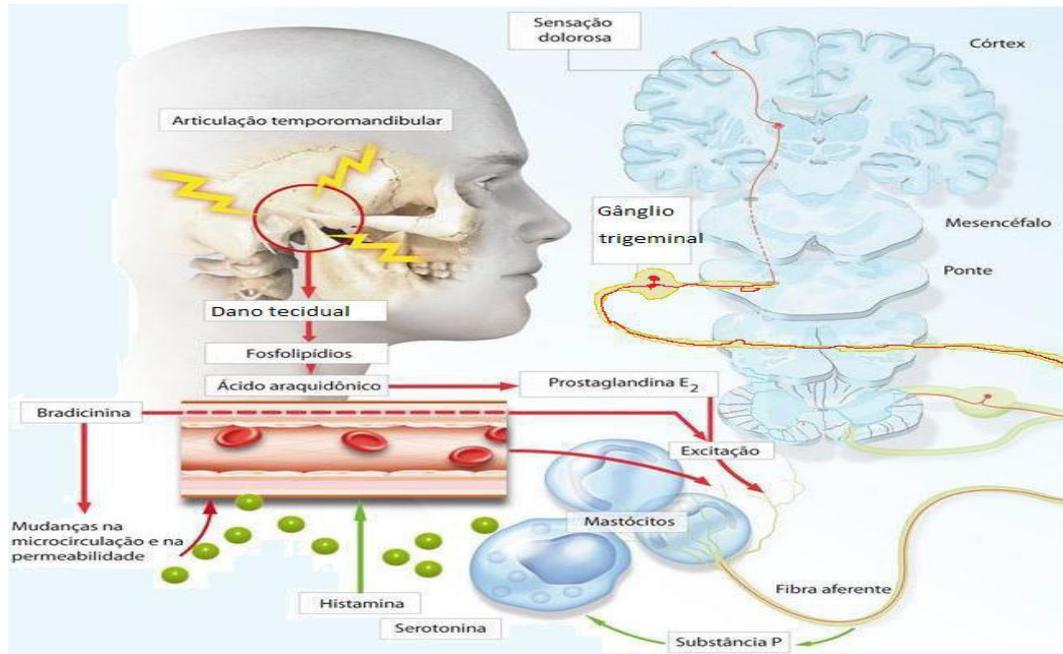
**Fonte:** WENINGER; BIRO; JAIN, 2014 (adaptado).

Interações fracas mediadas por selectinas possibilitam o rolamento dos leucócitos sobre a superfície do endotélio. Em seguida ocorre ativação das integrinas com subsequente adesão forte dos leucócitos às células endoteliais e por fim diapedese.

Os mediadores inflamatórios são responsáveis, pelo menos em parte, pela sensibilização periférica dos nociceptores (FERREIRA *et al.*, 1990). Em uma primeira fase de sensibilização dos nociceptores, durante a resposta inflamatória, citocinas, prostaglandinas (PG), aminas simpatomiméticas (dopamina ou noradrenalina), NO e histamina, oriundos de células residentes e recrutadas; bradicinina e serotonina, oriundas da cascata plasmática, e neuropeptídeos, advindos das terminações nervosas, são responsáveis pela manutenção e amplificação do processo inflamatório. Alguns mediadores podem ativar os nociceptores

(bradicinina e histamina) ou sensibilizá-los (PG) (**Figura 3**) (FONG; SCHUG, 2014; VERRI-JUNIOR *et al.*, 2006).

**Figura 3- Participação de células e de mediadores inflamatórios na dor orofacial**



**Fonte:** Adaptado de OKESON, 1998.

A sensibilização dos nociceptores leva a um estado de hipernocicepção ou hiperalgesia, que corresponde a um aumento da resposta a um estímulo doloroso (FONG; SCHUG, 2014). A ativação de nociceptores primários acoplados desencadeiam vias de sinalização intracelular como a da adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que ativa proteínas quinases do tipo A e C (ALEY *et al.*, 2000). Essas proteínas modulam a atividade de canais iônicos como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, diminuindo o limiar de excitabilidade e facilitando a transmissão do estímulo (PENA-DOS-SANTOS *et al.*, 2009). Além disso, sabe-se que o acionamento, principalmente, de receptores TRP (TRPV1 – vaniloide e TRPA1 - anquirina) é importante na ativação de nociceptores durante a inflamação, sendo eles responsáveis também pela alodínia e hiperalgesia (BASBAUM *et al.*, 2009).

PGs e as amins simpatomiméticas destacam-se ente os mediadores hiperalgésicos, pois estimulam a síntese de AMPC neuronal e sensibilizam os nociceptores (COUTAUX *et al.*, 2005). Portanto, substâncias capazes de estimular a síntese de PGs e de amins simpatomiméticas são consideradas hipernociceptivas, como as citocinas IL-1β, TNF-α e interleucina 8 (IL-8). O TNF-α tem papel crucial por ativar uma cascata de liberação de

citocinas, induzindo a liberação de IL-8, que leva à hipernocicepção mediada por agentes simpatomiméticos e a liberação de IL-1 $\beta$  e interleucina 6 (IL-6), que levam à hipernocicepção mediada por PGs (CUNHA *et al.*, 1992; 2005).

### 1.3 Disfunção Temporomandibular

A articulação temporomandibular (ATM) é uma das mais complexas articulações no corpo humano, sendo responsável pelos movimentos excursivos da mandíbula (OKESON, 2008; AUGUSTO *et al.*, 2016). É constituída, portanto, de tecidos moles e tecidos duros, compondo o sistema estomatognático, no qual também fazem parte a musculatura facial, dentes, periodonto, mucosa jugal, língua, glândulas, nervos e vasos sanguíneos (BARRETTO, 2013; OKESON, 2008). Os tecidos duros da ATM são formados por cabeça da mandíbula (côndilo) e osso temporal (fossa mandibular e eminência articular). Já os tecidos moles são constituídos por disco articular, membrana sinovial, cartilagem articular, ligamentos articulares como cápsula articular, ligamentos discais e ligamento temporomandibular (KURODA *et al.*, 2009; RANDO; WALDRON, 2012). Em conjunto, essas estruturas são extremamente importantes, pois são responsáveis por desenvolverem funções relacionadas à comunicação, respiração, alimentação e expressão emocional. Qualquer alteração em uma dessas estruturas poderá resultar no mau funcionamento desse sistema, acarretando importantes alterações emocionais, psicológicas, sociais e laborais (SIQUEIRA; TEIXEIRA, 2012; AUGUSTO *et al.*, 2016).

As DTMs são um grupo heterogêneo de condições musculoesqueléticas e neuromusculares envolvendo as ATM, os músculos mastigatórios e todos os tecidos relacionados (SU *et al.*, 2017; DE ROSSI, *et al.* 2014). A dor é um dos principais sintomas de pacientes com DTM, representando uma das fontes mais comuns de dor orofacial crônica (ZOTELLI *et al.*, 2017). Outros sintomas associados à DTM são cefaleia secundária, dor cervical, ruídos articulares, sintomas otológicos como zumbido e otalgia, e distúrbios do sono (SPECIALI; DACH, 2015; AUGUSTO *et al.*, 2016).

As DTMs são classificadas em articulares e musculares, e pode incluir também condições degenerativas das superfícies articulares da ATM, sendo a osteoartrite a mais prevalente, assim como o deslocamento do disco articular, que se refere à interrupção do relacionamento fisiológico entre as superfícies da ATM e o disco articular (BOUSNAKI *et al.*, 2017). Suas manifestações crônicas podem acarretar afastamento, incapacidade no

trabalho ou de atividades sociais, resultando na diminuição da qualidade de vida dos pacientes, além de altos custos em seu tratamento (GREENE *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que entre 40 a 75% da população mundial apresenta pelo menos um sinal de DTM, como a presença de sons articulares (ZOTELLI *et al.*, 2017), enquanto que 80% têm ou tiveram dor facial. Aproximadamente 6% destas pessoas têm sintomas graves o suficiente para exigir tratamento. Embora a DTM ocorra em ambos os sexos, estudos recentes têm mostrado maior prevalência em mulheres (SHAEFER *et al.*, 2013; ZOTELLI *et al.*, 2017).

No Brasil, poucos são os trabalhos epidemiológicos sobre a DTM. Um estudo recente realizado com estudantes universitários mostrou que a prevalência de DTM foi de 71,9% entre os investigados. Destes, 5,5% manifestaram uma forma mais grave de DTM (AUGUSTO *et al.*, 2016). A associação entre a DTM e sintomas otológicos e de bruxismo foi investida por Magalhães *et al.* (2017), entre os indivíduos com DTM, 58,2% apresentaram pelo menos um sintoma otológico e 52% apresentaram bruxismo. Assim, os autores mostraram que existem associações significativas entre a DTM e ambos os sintomas.

A etiologia da DTM é multifatorial, dentre as quais estão incluídos: traumas na região de face e pescoço, hábitos parafuncionais como onicofagia e bruxismo, hábitos posturais, hábitos ocupacionais, fatores hereditários, condições sistêmicas e distúrbios do sono (GAUER; SEMIDEY, 2015; SEIFI *et al.*, 2017). Fatores psicológicos como ansiedade, depressão e estresse também têm grande correlação (ZOTELLI *et al.*, 2017). O envolvimento de alterações sistêmicas relacionadas com doenças reumatológicas, como esclerose sistêmica, lúpus eritematoso sistêmico, fibromialgia e artrite reumatoide devem ser investigadas (FREDRIKSSON *et al.*, 2003).

Associação Americana de Dor Orofacial recomenda que o tratamento da DTM seja realizado quando existem indicações específicas e justificadas. Portanto, o tratamento inicial das DTM deve ser baseado no uso de modalidades terapêuticas conservadoras, reversíveis e baseadas em evidência (GREENE, 2010; SEIFI *et al.*, 2017).

As modalidades de tratamento existentes incluem terapias com placas oclusais, terapias físicas (termoterapia, laser, ultrassom, estimulação elétrica neural transcutânea-TENS), fisioterapia, terapia com exercícios, farmacoterapia, terapia cognitiva, acupuntura, agulhamento seco, viscosuplementação da ATM e procedimentos cirúrgicos como artroscopia, artrocentese, reposicionamento de disco e regularização das superfícies articulares (BOUSNAKI *et al.*, 2017; SEIFI *et al.*, 2017; BARRETTO *et al.*, 2013).

Trabalhos têm relatado que a inflamação articular exerce o papel de sensibilizar nociceptores, causando hiperalgesia e aumentando a excitabilidade dos neurônios aferentes primários. A dor articular pode, ainda, causar hiperatividade dos músculos mastigatórios, o que perpetua a condição da dor facial (TAKEUCHI *et al.*, 2004; TAKEDA *et al.*, 2006).

#### **1.4 Mediadores Envolvidos na Hipernocicepção Inflamatória da ATM**

Estudos desenvolvidos nos últimos anos relatam a participação de diversos mediadores inflamatórios na fisiopatologia das DTMs. Além disso, a inflamação na região da ATM tem sido considerada como a principal causa de dor relatada pelos pacientes portadores de DTM (YAMASAKI *et al.*, 2008). Essa inflamação pode ocorrer na membrana sinovial (sinovite) e/ou na cápsula (capsulite), podendo resultar de trauma local, infecção ou degeneração, ou ser parte de uma alteração na formação de colágeno ou poliartrite sistêmica, como por exemplo, a artrite reumatoide (LUND *et al.*, 2002; KRISTENSEN *et al.*, 2014).

Em modelos experimentais de inflamação articular, verificou-se que as primeiras células que migram para a articulação são os neutrófilos (ROCHA; ANDRADE; JANCAR, 1996). Essas células ativadas fagocitam os imunocomplexos formados nas fases iniciais e liberam espécies reativas de oxigênio, eicosanoides e fator de ativação plaquetária (PAF) no local da inflamação (ROCHA *et al.*, 1997). Esses mediadores ativam células residentes e infiltradas na articulação que interagem entre si, liberando citocinas, assim como sistemas sinalizadores da resposta imune-inflamatória (VENKATESHA *et al.*, 2011).

As citocinas estão diretamente relacionadas com muitos processos imunes associados com a patogênese na ATM. Numerosas citocinas são expressas e ativas funcionalmente em tecidos sinoviais e, quando ocorre um desarranjo interno na ATM, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 são as citocinas presentes em concentrações mais elevadas no líquido. Essas citocinas promovem a degradação da cartilagem e do osso através da ativação de condrócitos, células do disco articular, sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile) e fibroblastos da cartilagem articular a produzirem metaloproteinases de matriz (MMP), enzima que degrada irreversivelmente componentes da matriz extracelular (KOSTRZEWA-JANICKA *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2017).

O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina pró-inflamatória mediadora do processo inflamatório agudo e crônico, presente nos estágios iniciais de desenvolvimento da doença articular degenerativa, produzida principalmente por macrófagos (VASSALLI, 1992). Apresenta papel crucial por ativar uma cascata de liberação de citocinas, induzindo a

liberação de IL-8, que leva à hipernocicepção mediada por agentes simpatomiméticos e a liberação de IL-1 $\beta$  e IL-6, que levam à hipernocicepção mediada por prostaglandinas (CUNHA *et al.*, 1992; 2005). O efeito hiperalgésico do TNF- $\alpha$  em doenças articulares tem sido demonstrado em modelos experimentais e em estudos clínicos (LEE; CHO; SONG, 2010; VALE *et al.*, 2006).

A IL-1 $\beta$  é uma citocina pleiotrópica, possuindo um amplo espectro de atividades imunológicas e inflamatórias. Pode ser produzida por macrófagos da membrana sinovial, como também por condrócitos ou fibroblastos a partir de cartilagem articular. Estudos sugerem que IL-1 $\beta$  sensibiliza nociceptores e causa hiperalgisia, atuando na fisiopatologia da dor articular advinda da ATM em pacientes com DTM (KOSTRZEWA-JANICKA *et al.*, 2012; KEVILJ *et al.*, 2007; ALSTERGREN *et al.*, 2003). Além disso, IL-1 também contribui para a hipernocicepção inflamatória da ATM, aumentando a expressão de outras citocinas catabólicas, reduz a expressão de colágeno tipo II, induz a apoptose de condrócitos, via superprodução de NO, estimula a produção de PGE<sub>2</sub>, e moléculas de adesão (KIM *et al.*, 2012; GE *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2017).

O papel da cascata de citocinas na liberação de prostaglandinas e aminas simpáticas foi confirmado em ratos e camundongos (CUNHA *et al.*, 2005; 2010). A prostaglandina (PGE<sub>2</sub>) é um mediador inflamatório de marcante atuação na DTM, e provavelmente a enzima COX-2 é a principal responsável pelo seu aumento local durante o processo inflamatório de tecidos sinoviais devido à produção e atuação no controle de síntese dos eicosanoides. A PGE<sub>2</sub> encontra-se em elevadas concentrações nas articulações inflamadas e podem contribuir para a depleção da matriz extracelular causando erosão na cartilagem e no osso subcondral, vasodilatação, aumento da percepção de dor, desmineralização óssea e promoção da secreção de ativadores de plasminogênio (MCINNES; SCHETT, 2011). O uso de inibidores seletivos da COX-2 reduz a inflamação e a dor na ATM de ratos (KERINS *et al.*, 2004).

Serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é outro importante mediador inflamatório encontrado em níveis elevados no líquido sinovial da ATM de pacientes com dor inflamatória (ALSTERGREN *et al.*, 1999). É uma amina derivada do aminoácido triptofano, encontrada no SNC e em todos os tecidos periféricos, armazenada em mastócitos e plaquetas, liberada por estímulos como substância P e neuropeptídeo Y. Estudo realizado por Oliveira-Fusaro *et al.* (2012) mostrou que a 5-HT induz nocicepção na ATM pela ativação de receptores adrenérgicos  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 localizados na região da ATM e pela liberação local de

aminas simpáticas e prostaglandinas, que podem sensibilizar e/ou ativar os neurônios aferentes primários.

Os sistemas biológicos dispõem de vias contra regulatórias que também modulam a resposta inflamatória, ativando mecanismos de defesa em células expostas ao estresse, promovendo um *feedback* negativo na ativação celular e geração de mediadores inflamatórios. Neste contexto, a via opioide, canabinoide e do óxido nítrico (NO/GMPc) mostram sua relevância, assim como a via hemeoxigenase (HO) (CHAVES *et al.*, 2011; VENKATESHA *et al.*, 2011).

O sistema canabinoide é conhecido por desempenhar um papel importante na modulação da dor aguda e crônica (KANO *et al.*, 2009; SAGAR *et al.*, 2012). Atualmente são conhecidos dois subtipos de receptores canabinoides (CB1 e CB2) pertencentes à superfamília dos receptores de membrana ligados à proteína G (GPCR) (HOWLETT, 2002; VEMURI *et al.*, 2015), cuja ativação inibe a adenilato-ciclase e ativa quinases como a MAPK, e no caso dos receptores CB1, há ainda uma modulação de canais iônicos, especialmente com fechamento dos canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem e abertura dos canais de  $K^{+}$  (PERTWEE, 2010; MCDONOUGH *et al.*, 2014).

Estudos têm mostrado que a ativação dos receptores CB1 no SNC na medula espinal e tecido periférico inibe respostas nociceptivas (HAMMA; SAGEN, 2011) e inflamatórias (RICHARDSON *et al.*, 2008). Enquanto que, agonistas do receptor CB2 apresentam significativos efeitos antinociceptivos em vários modelos animais através de mecanismos supraespinhais e periféricos (PERTWEE, 2010; HOHMANN, 2002), tais como os modelos de dor articular (LA PORTA *et al.*, 2013), crônica (BURSTON *et al.*, 2013) e inflamatória (QUARTILHO *et al.*, 2003). Além disso, alguns estudos sugerem que os canabinoides alteram o equilíbrio da produção de citocinas, promovendo uma mudança na resposta pró para anti-inflamatória (CROXFORD; YAMAMURA, 2005; NAGARKATTI *et al.*, 2009).

A ativação dos receptores CB1 inibe a hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina na ATM de ratos (BURGOS *et al.*, 2010). Além disso, Gondim *et al.* (2012) mostraram que os receptores canabinoides medeiam o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da eletroacupuntura na ATM de ratos com artrite. Esses dados sugerem que o sistema canabinoide pode ser um importante alvo terapêutico para o tratamento da dor e inflamação associada à ATM (MCDONOUGH *et al.*, 2014).

Outro importante mediador da resposta imune-inflamatória é o óxido nítrico (NO), envolvido em vários processos fisiológicos, desempenha um papel complexo e dual na

modulação da dor e inflamação, podendo induzir ou inibir a dor dependendo da concentração e local de ação (CURY *et al.*, 2011). O NO é produzido pelas células residentes articulares, sinoviócitos e condrócitos, assim como, por osteoblastos e osteoclastos, e também por células inflamatórias presentes durante patologias, de forma constitutiva ou induzida por mediadores como IL-1 e TNF- $\alpha$  (MCINNES *et al.*, 1996; EVANS; RALSTON, 1996).

Em relação ao efeito antinociceptivo do NO, estudos tem demonstrado que doadores de NO ou substâncias que aumentam sua concentração neuronal bloqueiam de forma direta a hiperalgesia inflamatória (CURY *et al.*, 2011). Em neurônios nociceptivos, o NO ativa a enzima guanilil ciclase, resultando em um aumento acentuado do GMPc (GRIFFITHS *et al.*, 2003), que, por sua vez, ativa a proteinoquinase dependente do GMPc (PKG), a qual parece ser responsável pela fosforilação dos canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP. A ativação desta via causa uma hiperpolarização dos neurônios nociceptivos diminuindo a excitabilidade neuronal durante o processo inflamatório (CUNHA *et al.*, 2010).

Os opioides endógenos diminuem a excitabilidade neuronal, provocam analgesia e antinocicepção através da ativação dos receptores Mu ( $\mu$ ), Delta ( $\delta$ ) e Kappa ( $\kappa$ ), os quais pertencem a superfamília de receptores acoplados à proteína G. Dentre os efeitos dos opioides está o efeito analgésico na dor de caráter inflamatório. A ativação dos opioides também inibe produção de AMPc, promovendo o fechamento dos canais de  $Ca^{2+}$  e a abertura de canais de  $K^+$ . Esses eventos atenuam a excitabilidade do neurônio sensorial aferente e isso leva a uma diminuição da liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios (substância P) com a produção de antinocicepção e ação anti-inflamatória (BUSCH-DIENSTFERTIG *et al.*, 2010).

É sabido que no sistema nervoso periférico, os opioides produzem um efeito analgésico mediado pela ativação de receptores opioides em neurônios aferentes primários nociceptivos (CLEMENTE-NAPIMOGA *et al.*, 2009), que ativam a via intracelular (NO/GMPc), resultando em hiperpolarização de membrana (FERREIRA *et al.*, 1991). Além disso, recentemente foi demonstrado que a antinocicepção periférica induzida por agonistas de receptores opioides  $\mu$  e  $\kappa$  é devido à fosforilação das enzimas PI3K $\gamma$  / Proteína quinase B, que é acompanhada por ativação da NOSn e produção de NO, o que induz um aumento nas correntes do canal  $K^+_{ATP}$  causando hiperpolarização dos neurônios nociceptivos (CUNHA *et al.*, 2012; LAMANA *et al.*, 2017).

Já a hemeoxigenase (HO) é uma enzima microsomal que catalisa a degradação do grupo heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro (ABRAHAM; KAPPAS, 2008). O grupo heme em sua forma livre é potencialmente tóxico para a célula, por estimular a produção de radicais livres, aumento da permeabilidade vascular, expressão de

moléculas de adesão e a infiltração de neutrófilos para o sítio inflamatório, HO exerce sua ação citoprotetora degradando-o e gerando seus produtos finais (ALCARAZ *et al.*, 2003; SOARES; BACH, 2009).

A ativação de HO-1 (forma induzida) reduz o dano oxidativo e apoptose, os eventos inflamatórios como edema, migração celular e produção de citocinas pró-inflamatórias (ALCARAZ *et al.*, 2003). Em estudos sobre a hipernocicepção inflamatória na ATM induzida por Zymosan (Zy), foi observado que a via da HO-1, ao ser estimulada foi capaz de reduzir a dor facial, o influxo leucocitário e a atividade da enzima mieloperoxidase, assim como todos os parâmetros histológicos (CHAVES, 2012).

### **1.5 Fármacos Utilizados no Tratamento das Disfunções Temporomandibulares**

O tratamento inicial das DTM, mesmo tendo uma etiologia multifatorial, tem como objetivo o emprego de métodos conservadores para aliviar a dor, reduzir o processo inflamatório, quando presente, evitar ou diminuir os danos nas articulações, prevenir manifestações extra-articulares e melhorar a função e o bem-estar do paciente (HERSH *et al.*, 2008; CAIRNS, 2010).

O controle farmacológico da dor inflamatória relacionada às DTM é baseado em duas estratégias: a primeira envolve o uso de fármacos que inibem a sensibilização periférica do nociceptor diminuindo os mediadores inflamatórios, tal como drogas anti-inflamatórias não-estereoidais (AINEs) e glicocorticoides (HERSH *et al.*, 2008; CAIRNS, 2010); a segunda estratégia envolve o uso de drogas que bloqueiam diretamente a dor como os anestésicos e opioides (CAIRNS, 2010). Ansiolíticos, relaxantes musculares, antidepressivos, anticonvulsivantes e benzodiazepínicos também podem ser utilizados, principalmente em situações de dor crônica (GAUER; SEMIDEY, 2015; RAJAN; SUN, 2017).

Os AINEs constituem a classe de fármacos mais prescritos e utilizados no mundo, são os medicamentos de escolha para o controle da dor aguda e inflamatória na maioria das DTM, particularmente indicados nos casos de artralgiás, artrite e dores musculares (HÆAGGMAN-HENRIKSON *et al.*, 2017; GREMEAUX *et al.*, 2013). Sua atividade anti-inflamatória ocorre, principalmente, pela inibição da síntese de PG, efetuada mediante a inibição das ciclo-oxigenases constitutiva (COX-1) e induzível (COX-2). A primeira é responsável pelos efeitos fisiológicos das PG em sítios gástricos e renais. A enzima COX-2 é a isoforma induzida localmente na presença de dano tecidual por estímulos inflamatórios e citocinas (SOSTRES *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2013).

Os efeitos adversos relacionados à toxicidade gastrointestinal e renal são os relatos mais comuns de pacientes que utilizam AINEs convencionais, e representam risco de vida para os que fazem uso crônico (AYGÜN *et al.*, 2012). Os sintomas variam muito em severidade, e incluem náuseas, dispepsia e ulceração. Esses efeitos estão associados com a inibição da COX-1, responsável por formar PG homeostáticas (PG<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>), consideradas protetoras da mucosa gástrica e também presentes nos rins (SOSTRES *et al.*, 2010). Entretanto, a inibição da COX-2 também provoca efeitos adversos relacionados principalmente a eventos trombóticos cardiovasculares, renais e aterosclerose (ANWAR; ANWAR; DELAFONTAINE, 2015).

Meloxicam e nimesulida são considerados inibidores preferenciais da COX-2, sendo a nimesulida muito utilizada no tratamento de osteoartrite (LEES *et al.*, 2004). Com relação à indometacina, derivada do ácido indolacético, faz parte dos AINEs não seletivos para COX-2. Apresenta propriedades anti-inflamatória, analgésicas e antipiréticas e seu mecanismo de ação abrange a inibição da síntese de todas as PGs, por bloqueio reversível da via mediada pelas ciclo-oxigenases (RAFFIN *et al.*, 2003; SCHOLZ *et al.*, 2012).

Os glicocorticoides são agentes anti-inflamatórios potentes indicados como coadjuvantes no tratamento de dores agudas e crônicas, amplamente utilizados nos pacientes que sofrem de sinovite e osteoartrite/artrite reumatoide na ATM, podem ser administrados oralmente ou injetados diretamente na articulação (COELHO *et al.*, 2015; HERSH *et al.*, 2008). Os glicocorticoides inibem o gene da COX-2 e induzem a produção da proteína lipocortina, que inibe a enzima fosfolipase A<sub>2</sub>. Além disso, reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), modulam o fator de transcrição NF- $\kappa$ B e também desencadeiam a apoptose em diversos tipos de células (ZAMAN *et al.*, 2014; SATO *et al.*, 2010). A dexametasona é um potente glicocorticoide sintético largamente utilizado, possui propriedades imunossupressora e anti-inflamatória (RHODUS, 2006).

No entanto, o uso de glicocorticoides orais deve ser limitado devido aos riscos causados como a diminuição da resistência à infecção, hiperglicemia, osteoporose, distúrbios cardiovasculares (hipercoagulabilidade) e psiquiátricos (COELHO *et al.*, 2015).

Os analgésicos opioides são substâncias com efeito analgésico atuando potencialmente no SNC, alterando a percepção do indivíduo, levando à diminuição da dor. Opiáceos, como a morfina, representam atualmente a melhor opção para o controle da dor moderada a grave em trauma induzidos, pós-operatório e na dor oncológica. O uso de opioides na dor crônica não oncológica permanece controverso, pois a morfina ocasiona alguns efeitos indesejáveis, como: euforia, náuseas, vômitos, depressão respiratória, dependência

física e psicológica, constipação e algumas vezes espasmo biliar e uretral (SILVA; SAKATA; ISSY, 2004). A administração prolongada de opioides pode desenvolver no indivíduo uma tolerância antinociceptiva, além de dependência (O'NEIL *et al.*, 2012; GAUER; SEMIDEY, 2015).

A naloxona antagoniza as ações analgésicas, assim como outros efeitos da morfina tais como a depressão respiratória. Além disso, bloqueia a ação dos fármacos semelhantes à morfina e tem sido amplamente usada como padrão para determinar se a analgesia é mediada por um mecanismo opioide, particularmente na transmissão da dor. A naloxona foi o primeiro antagonista puro de opioides, tendo afinidade por todos os três receptores de opioides:  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  (PICCOLO, GIORGI, CURY, 2000; MADENOGLU *et al.*, 2010).

O uso de opiáceos para as DTM deve ser recomendado apenas para pacientes que tenham comprovado alguma disfunção intratável ou em procedimentos cirúrgicos ou implantes que tenham sido realizados sem sucesso. Em procedimentos operatórios ou no tratamento de distúrbios intracapsular, a morfina tem sido administrada intra-articularmente. Alguns relatos sugerem a existência de receptores periféricos opiáceos nos tecidos da ATM, o que pode explicar os benefícios deste tratamento (HERSH *et al.*, 2008).

Apesar do curso extremamente incapacitante das DTM, todos os fármacos supracitados utilizados para o controle da dor são limitados, aliviando apenas os sinais e sintomas da doença. Cairns (2010) relata que intervenções farmacológicas no controle de dores orofaciais crônicas normalmente são consideradas terapias adjuntas a tratamentos definitivos, não trazendo necessariamente a cura. Assim, o desenvolvimento de novas drogas ou a utilização de diferentes estratégias farmacológicas para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas continua sendo de extrema importância, e a busca por novos compostos mais efetivos e com baixa toxicidade, possuindo efeitos adversos mínimos, vem sendo alvo de muitas pesquisas.

Nesse contexto, as algas marinhas são consideradas uma fonte potencial na bioprospecção de novos fármacos, pois são ricas em diversos compostos químicos biologicamente ativos, como as lectinas, que possuem capacidade anti-inflamatória, antinociceptiva e imunoestimulatória (SINGH; THAKUR; BANSAL, 2013; ABREU *et al.*, 2016a).

## 1.6 Algas Marinhas

O termo “alga” não possui significado taxonômico formal, mas é geralmente usado para indicar um grupo polifilético (eucariotos fotossintetizantes), que inclui organismos que não compartilham uma origem comum. Possui representantes nos Domínios Eubacteria e Eukarya, estando distribuída nos quatros reinos: Bacteria, Plantae, Chromista e Protozoa (RAVEN; GIORDANO, 2014; GUIRY, 2012).

As algas estão distribuídas em 15 filos e 54 classes segundo critérios químicos, citológicos e morfológicos. Existem cerca de 72500 espécies de algas validamente descritas. A maioria das algas marinhas é fotossintética e vive em habitats aquáticos, embora algumas cresçam em solos úmidos. Contribuem para os ciclos biogeoquímicos sendo responsáveis por cerca da metade da produtividade primária global de assimilação de dióxido de carbono e produção de oxigênio (DE CARVALHO; ROQUE, 2000; GUIRY, 2012).

Além disso, sendo produtores primários, as algas possuem semelhantes funções biológicas e ecológicas às plantas, mas não compartilham uma história evolutiva comum, e sua bioquímica difere significativamente em relação aos pigmentos acessórios, polissacarídeos de reserva, glicoproteínas e compostos fenólicos (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

As algas têm uma grande variedade de formas e tamanhos, de células esféricas com 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, como as algas unicelulares (microalgas), a longos talos multicelulares com até mais de 60 m de comprimento, como as kelps (macroalgas) (RAVEN; GIORDANO, 2014; EL GAMAL, 2010).

As macroalgas marinhas não são vascularizadas, contêm clorofila “a” e apresentam estruturas reprodutivas simples. Sua classificação botânica é dada de acordo com a genealogia de seus plastídios, estrutura física, função e ciclo reprodutivo em: Chlorophyta (algas verdes), principalmente pela predominância das clorofilas a e b; Ochrophyta (algas pardas), principalmente pela presença dos pigmentos xantofila e fucoxantina, e Rhodophyta (algas vermelhas), devido à predominância dos pigmentos ficoeritrina e ficocianina (DAHMS; DOBRETSOV, 2017; BONANNO; ORLANDO-BONACA, 2017).

De acordo com os seis reinos propostos por Cavalier-Smith (2004) e aplicados por Alga e Base (2017), Rhodophyta e Chlorophyta estão incluídos no Reino Plantae, enquanto Ochrophyta está no Reino Chromista (BONANNO; ORLANDO-BONACA, 2017).

O grupo das algas verdes, objetivo deste trabalho, possui cerca de 4.500 espécies, que ocorre principalmente em habitats marinhos tropicais e subtropicais. Os principais

gêneros desse filo incluem *Ulva*, *Codium*, *Enteromorpha*, *Chaetomorpha* e *Cladophora* (GUIRY, 2012).

As algas marinhas têm sido bastante utilizadas como fontes de alimento, pois apresentam em sua composição fibras, minerais, antioxidantes, vitaminas, pigmentos, polissacarídeos, proteínas e ácidos graxos (TORRES *et al.*, 2014). Além disso, a diversidade bioquímica das algas marinhas faz com que esses organismos representem uma valiosa fonte de novos compostos químicos, os quais têm revelado importantes resultados nas mais variadas aplicações industriais, biotecnológicas e farmacêuticas (FARVIN; JACOBSEN, 2012). Recentes avanços na pesquisa de novos fármacos, a partir de fontes naturais, apontam as macroalgas marinhas como um grupo promissor no fornecimento de compostos bioquimicamente ativos (DAHMS; DOBRETSOV, 2017). Podemos destacar dentre esses compostos as lectinas.

### **1.6.1 Lectinas**

A palavra lectina é proveniente do latim *Legere*, que significa selecionar ou escolher, e foi utilizada para definir uma classe de aglutininas de plantas superiores. Esse termo foi usado pela primeira vez por Boyd e Shapleigh (1954), os quais as definiram como proteínas que se ligam reversivelmente a carboidratos, aglutinando células e/ou precipitando polissacarídeos e glicoproteínas (JUAN *et al.*, 2017).

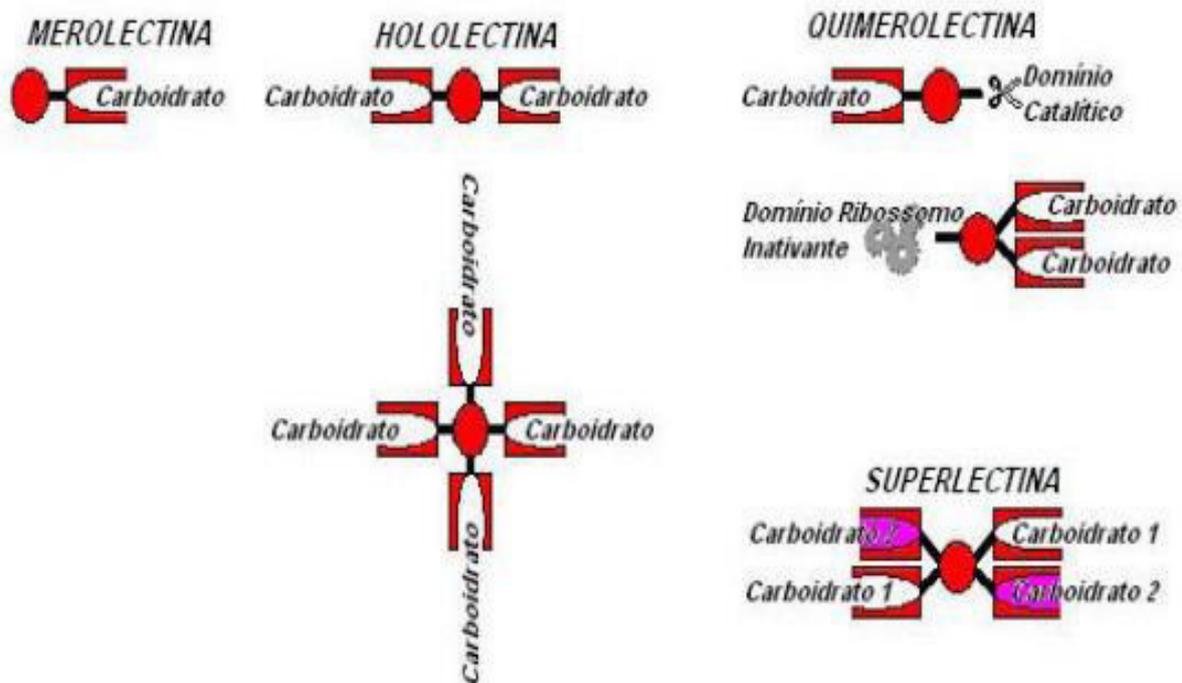
Ao longo dos anos, muitas definições foram dadas. A mais utilizada na comunidade científica foi proposta por Peumans e Van Damme (1995), na qual lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune contendo pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. Essa ligação a resíduos de carboidratos pode ser de alta especificidade, mas não altera a estrutura química dos ligantes.

Posteriormente, Gabius *et al.* (2011) definiram as lectinas como proteínas ligantes a carboidratos que não possuem atividade enzimática sobre seus ligantes. Além disso, diferem dos anticorpos e de proteínas de transporte para mono ou oligossacarídeos livres (COELHO *et al.*, 2017).

As lectinas possuem ampla distribuição na natureza e já foram isoladas em vírus, bactérias, fungos, algas, plantas superiores e animais (HAMSHOU *et al.*, 2013; COELHO *et al.*, 2017). De acordo com suas características estruturais, as lectinas são subdivididas em

quatro grupos (**Figura 4**): merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

**Figura 4- Classificação estrutural das lectinas**



**Fonte:** Togashi, 2010. Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

As merolectinas são proteínas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidratos e, por conta dessa natureza monovalente, não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados (PARIJS *et al.*, 1991).

Com relação às hololectinas, essas apresentam dois ou mais domínios idênticos ou bastante homólogos, que se ligam ao mesmo carboidrato ou a açúcares de estrutura similar e, portanto, são capazes de promover a aglutinação de células e/ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas conhecidas como hemaglutininas pertence a esse grupo, como a lectina da *Canavalia braziliensis* (ConBr) (CAVADA *et al.*, 2001).

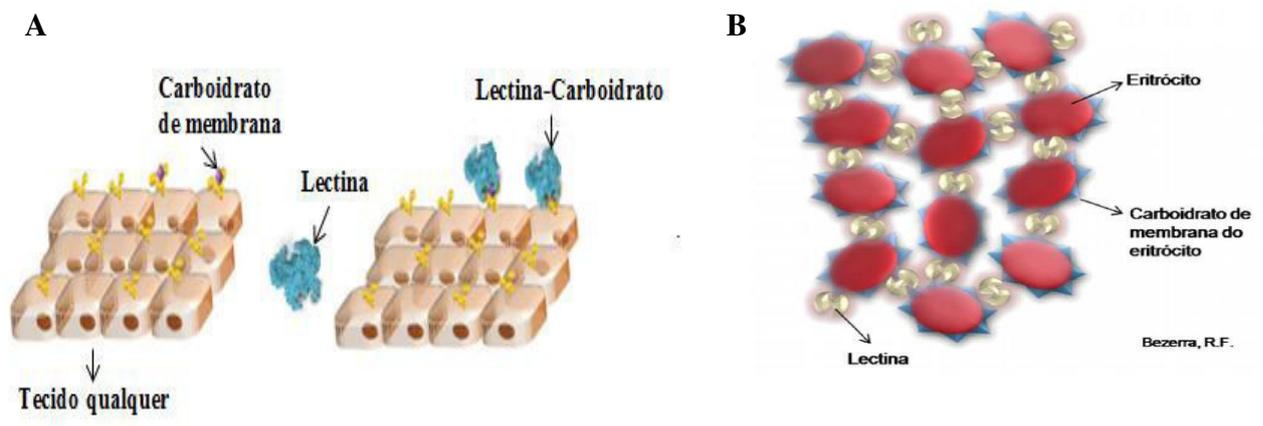
Já as quimerolectinas possuem um ou mais domínios ligantes a carboidratos e um domínio não relacionado, que podem apresentar atividade catalítica ou qualquer outra atividade biológica, atuando independentemente dos domínios ligantes a carboidratos. A ricina, toxina da mamona, que é uma proteína inativadora do ribossomo (RIP), é um exemplo de quimerolectina, pois possui dois domínios de ligação para carboidratos e um domínio para a inativação do ribossomo (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

Por último, as superlectinas apresentam carboidratos, os quais são estruturalmente distintos e reconhecem carboidratos diferentes (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

Os mecanismos utilizados pelas lectinas para gerar especificidade por carboidratos incluem a formação de pontes de hidrogênio natureza quimérica que consistem de, no mínimo, dois domínios ligantes a com moléculas de água, interações hidrofóbicas, modificações pós-traducionais e oligomerizações (COELHO *et al.*, 2017; VIJAYAN; CHANDRA, 1999). Devido ao potencial de interações proteína-carboidrato (**Figura 5A**), essas moléculas são ferramentas valiosas em diversos processos biológicos e biotecnológicos, incluindo diagnóstico, aplicações terapêuticas e farmacológicas, interações patógeno-hospedeiro, reconhecimento celular, comunicação célula-célula, bioadesão de fármacos, indução de apoptose, metástases e diferenciação celular (ZIÓŁKOWSKA; WLODAWER, 2006; JUAN *et al.*, 2017).

Adicionalmente, como as lectinas também reconhecem carboidratos de fluidos biológicos, podem se ligar a certos componentes da membrana das células sanguíneas, provocando aglutinação (**Figura 5B**). Essa função de aglutinação representa a principal maneira de detecção, purificação e caracterização dessas moléculas (LIS; SHARON, 1998).

**Figura 5 - Representação esquemática da interação lectina-carboidratos: (A) tecido qualquer e (B) eritrócitos**



Fonte: Coelho *et al.*, 2017 (adaptado) (A); Bezerra, 2009 (B).

#### 1.6.1.1 Lectinas de Algas Marinhas

No geral, as lectinas de algas marinhas apresentam baixo peso molecular, não possuem afinidade para monossacarídeos, têm forte especificidade para oligossacarídeos e/ou

glicoproteínas complexas, são termoestáveis e não requerem cátions divalentes para a sua atividade biológica (ROGERS; HORI, 1993; AINOUZ *et al.*, 1995). Além disso, ocorrem principalmente na forma monomérica, têm uma alta proporção de aminoácidos ácidos e apresentam pontos isoelétricos entre 4 e 6 (PÉREZ; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2016). No entanto, existem alguns relatos mostrando que algumas lectinas podem ser inibidas por açúcares simples, como as do gênero *Enteromorpha*, *Ulva* e *Codium* (ALVAREZ-HERNANDEZ *et al.*, 1999; AMBROSIO *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004), bem como podem ser dependentes de cátions divalentes, como é o caso da lectina da alga marinha vermelha *Ptilota filicina* (SAMPAIO; ROGERS; BARWELL, 1998).

As lectinas são encontradas nos corpos proteicos das células, que são ricos em proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático e transportadas via Golgi (CARDOZO *et al.*, 2007). Não existem muitos relatos sobre a localização intracelular específica das lectinas nas algas. No entanto, um estudo com as algas vermelhas *Hypnea musciformis* e *H. cervicornis* mostrou que essas algas possuem uma maior concentração de lectinas na parede celular e no citoplasma, e que essas proteínas estão ausentes nos vacúolos (MIGUEL *et al.*, 2014).

Nos vegetais superiores, as lectinas estão envolvidas no processo de defesa contra bactérias e fungos patogênicos (LIAO *et al.*, 2003) ou atuam como reserva de nutrientes (CAVADA *et al.*, 1990). No entanto, pouco se sabe sobre o papel fisiológico das lectinas das algas. Estudo realizado com a lectina da alga *Antithamnion sparsum* mostrou que essa proteína está envolvida no reconhecimento célula-célula, durante a fertilização (KIM *et al.*, 1996). Trabalhos com as lectinas das algas *Bryopsis hypnoides* e *Codium fragile* sugerem que elas podem estar envolvidas na regeneração e reorganização do protoplastos, respectivamente (NIU *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2008). Adicionalmente, nas algas *H. musciformis* e *H. cervicornis*, as lectinas podem estar envolvidas na agregação do citoplasma e no reconhecimento de carboidratos da parede celular (MIGUEL *et al.*, 2014).

Boyd *et al.* (1966) fizeram o primeiro relato de atividade hemaglutinante em 24 extratos de algas marinhas. Posteriormente, outros estudos que descrevem a presença e/ou purificação de lectinas de algas foram relatados por grupos da Inglaterra (BLUNDEN *et al.*, 1975), Japão (KAMIYA *et al.*, 1982), Espanha (FABREGAS *et al.*, 1984) e Estados Unidos (CHILES *et al.*, 1989). No Brasil, as pesquisas de lectinas de algas marinhas iniciaram apenas no ano de 1991 com Ainouz e Sampaio.

Comparando os estudos de lectinas isoladas de plantas com as de algas, ainda são poucos os trabalhos de detecção e isolamento de lectinas de algas. Estima-se que existam

menos de 100 publicações na qual descrevem a presença de lectinas de algas marinhas (TEIXEIRA *et al.*, 2012). Isso se deve, principalmente, ao baixo rendimento lectínico que as algas possuem (NAGANO *et al.*, 2005). Portanto, em relação às lectinas caracterizadas de fontes animais e de plantas, pouco é conhecido sobre as propriedades bioquímicas e estruturais das lectinas macroalgais (HARNEDY; FITZGERALD, 2011).

Os métodos clássicos utilizados para isolar lectinas de algas marinhas incluem métodos de extração das proteínas solúveis em soluções salinas tamponantes. Para sua purificação, o extrato total obtido pode ser submetido a precipitações de proteínas (sal ou etanol), a procedimentos cromatográficos (sequenciais ou não) e depois a eletroforese. Dentre esses procedimentos estão as cromatografias gasosas, de troca iônica, de interação hidrofóbica, de filtração em gel e de afinidade. A cromatografia de troca iônica é muito eficiente na separação e na eliminação de pigmentos, principalmente nas fases iniciais das etapas de purificação (HARNEDY; FITZGERALD, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

A primeira lectina de alga marinha a ser purificada e caracterizada parcialmente foi a da alga vermelha *Ptilota plumosa* (ROGERS; BLUNDEN; EVANS, 1977). As lectinas isoladas podem ser caracterizadas estruturalmente por meio de diversas técnicas, tais como: espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência, cristalografia e difração de raios X, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas (NEHIRA *et al.*, 2012). O estudo da estrutura química dessas proteínas é importante para tentar correlacionar alguns detalhes estruturais com as atividades biológicas e, assim, entender as diferentes atividades das lectinas, ou propriedades físico-químicas apresentadas pelas mesmas (NAGANO *et al.*, 2005a).

Apesar do aumento no número de trabalhos referentes às lectinas de macroalgas marinhas, as informações bioquímicas e estruturais são escassas. Mesmo com poucos dados sobre a estrutura primária dessas proteínas, as informações disponíveis, até o momento, apontam para a existência de uma grande variedade de famílias de lectinas nas diferentes espécies de macroalgas marinhas (TEIXEIRA *et al.*, 2012; CALVETE *et al.*, 2000).

#### *1.6.1.2 Aplicações e Atividades Biológicas de Lectinas de Algas Marinhas*

A capacidade de interagir com carboidratos faz das lectinas uma molécula valiosa que pode ser usada em diversos processos biológicos e biotecnológicos (HAMSHOU *et al.*, 2013; COELHO *et al.*, 2017). Por conta disso, as pesquisas com lectinas vêm crescendo em todo o mundo. Segundo Rogers e Hori (1993), as lectinas de algas marinhas seriam mais

apropriadas para o uso como ferramentas biológicas, pois possuem uma massa molecular menor quando comparadas com as lectinas de plantas, reduzindo as chances de uma reação antigênica. Ademais, essas lectinas apresentam grande estabilidade, devido às pontes dissulfeto presentes em sua estrutura, e mostram uma alta especificidade por glicoconjugados complexos, como os presentes na superfície das células (PINTO *et al.*, 2009).

Nesse sentido, as lectinas de algas marinhas foram usadas com eficiência para estimular e/ou inibir divisão celular (HORI *et al.*, 1988; HARNEDY; FITZGERALD, 2011), reconhecer células leucêmicas e tumorais (CHAVES *et al.*, 2017; HAYASHI *et al.*, 2012), induzir a apoptose celular de células humanas cancerosas e derivadas de camundongos BALB/c (OMOKAWA *et al.*, 2010), estimular e/ou inibir o crescimento de micro-organismos (HOLANDA *et al.*, 2005), induzir a cicatrização (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012), combater vírus (MU *et al.*, 2017; SATO *et al.*, 2015), dentre outros.

As lectinas de algas também podem ter ação no sistema nervoso central. Um estudo realizado recentemente mostrou que a lectina da alga marinha vermelha *S. filiformis*, apresentou efeito antidepressivo-símile, com um mecanismo de ação, provavelmente, relacionado à interação dessa lectina com o sistema dopaminérgico e à sua capacidade antioxidante em áreas cerebrais relacionadas à depressão (ABREU, 2016b).

Alguns trabalhos relatam que essas proteínas têm a capacidade de modular a resposta imune, podendo ser pró ou anti-inflamatórias (NEVES *et al.*, 2001; VANDERLEI *et al.*, 2010).

As lectinas isoladas das algas marinhas vermelhas *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Amansia multifida* e *Gracilaria caudata* apresentaram efeitos pró-inflamatórios, induzindo a migração de neutrófilos em modelos de peritonite e de bolsa de ar em ratos e camundongos, os mecanismos de ação envolvidos nesse efeito são desconhecidos (NEVES *et al.*, 2001). Posteriormente, foi mostrado que as lectinas das algas *B. triquetrum* e *B. seaforthii* possuem também efeitos nociceptivos periféricos e centrais revertidos por naloxona, um antagonista da morfina, sugerindo a participação do sistema opioide na atividade antinociceptiva observada (VIANA *et al.*, 2002)

Já as lectinas das algas *Pterocladia capillacea*, *Hypnea cervicornis* e *Solieria filiformis* apresentaram tanto efeito anti-inflamatório como antinociceptivo (SILVA *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2010; ABREU *et al.*, 2016a). Além disso, Abreu *et al.* (2012) mostraram que as lectinas das algas *S. filiformis*, *P. capillacea* e *C. cupressoides* apresentam propriedades imunoestimulatórias sem provocar citotoxicidade, quando em contato com esplenócitos de camundongos BALB/c.

### 1.6.1.3 Lectina da Alga Marinha Verde *Caulerpa cupressoides*

*Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium* C. Agardh é uma espécie de alga verde, pertencente à família Caulerpaceae amplamente encontrada na costa do Nordeste do Brasil. A lectina da alga *C. cupressoides* (LCc) foi isolada por Benevides *et al.* (2001), através de cromatografia de afinidade em gel de  $\alpha$ -lactose-agarose, seguida de filtração em gel (Bio Gel P-100). A atividade hemaglutinante da LCc não é dependente de cátions divalentes, é inibida por lactose e alguns dos seus derivados e é fortemente inibida pela glicoproteína mucina. Quando submetida ao tratamento térmico, foi estável a 70 °C, durante 60 minutos, e ainda manteve 25% de sua atividade original, mesmo depois de 60 min a 90 °C. O peso molecular aparente (PM) de LCc, determinado pela cromatografia de filtração em gel, foi de 44,700 Da. Nesse mesmo estudo, foi realizado uma eletroforese SDS-PAGE, na qual a lectina exibiu uma única banda de proteína com um PM de 23,158 Da, sugerindo que LCc seja uma proteína dimérica.

Posteriormente, Rivanor *et al.* (2014) purificaram a mesma lectina, utilizando a metodologia supracitada, com algumas modificações. A lectina foi purificada através de extração com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose.

Pouco se sabe sobre sua caracterização, quanto à composição de aminoácidos, porém, LCc apresentou uma maior presença dos aminoácidos glicina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina e uma baixa presença de aminoácidos básicos (BENEVIDES *et al.*, 2001). Além disso, possui na sua sequência NH<sub>2</sub>-terminal 31 resíduos de aminoácidos: **KGTCALDDRLEPGFARAGEAFRQTTAKDATS**, apresentando 43% de identidade com a proteína da microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* após o alinhamento dessa extremidade NH<sub>2</sub>-terminal com sequências proteicas não redundantes através do algoritmo BLASTp (QUEIROZ, 2013).

Com relação ao potencial biotecnológico de LCc, estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que a referida proteína apresenta atividade imunoestimulante *in vitro* (ABREU *et al.*, 2012), efeito antinociceptivo e anti-inflamatório em modelos clássicos de nocicepção e inflamação *in vivo*, quando administrada sistemicamente (VANDERLEI *et al.*, 2010; DE QUEIROZ *et al.*, 2015), efeito pró-inflamatório, quando administrada localmente (edema de pata) (DE QUEIROZ *et al.*, 2015), e reduz a hipernocicepção mecânica e o infiltrado celular inflamatório na artrite induzida por Zy na articulação tempormandibular (ATM) de ratos. Esses dados indicam que a LCc é uma molécula promissora para o

tratamento das condições inflamatórias associadas às disfunções tempomandibulares (DTM) (RIVANOR *et al.*, 2014).

Além disso, a avaliação preliminar das propriedades tóxicas da LCc foi realizada através do teste de toxicidade subcrônica, quando administrada em camundongos por via intravenosa durante 7 dias, evidenciando que essa lectina não apresentou toxicidade nos parâmetros analisados (VANDERLEI *et al.*, 2010).

Embasados na demonstração prévia dos efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo da lectina isolada da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides*, esse trabalho tem o intuito de contribuir com informações relacionadas à estrutura dessa molécula, bem como contribuir com informações relacionadas ao seu mecanismo de ação sobre a hipernocicepção inflamatória na ATM, podendo, assim, abrir novas fronteiras de conhecimento sobre a ação moduladora dessa molécula, no intuito de identificar futuramente uma nova abordagem terapêutica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Caracterizar parcialmente a estrutura da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides*, investigando sua eficácia e possíveis mecanismos envolvidos na hipernocicepção inflamatória da articulação temporomandibular de ratos.

### 2.2 Específicos

- ✓ Caracterizar parcialmente a estrutura da lectina isolada da alga *C. cupressoides* (LCc);
- ✓ Investigar a eficácia antinociceptiva e anti-inflamatória da LCc sobre a hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina, Carragenana, Serotonina e Capsaicina na ATM de ratos;
- ✓ Avaliar a participação de mastócitos na eficácia da LCc;
- ✓ Determinar as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido periarticular de ratos tratados com LCc;
- ✓ Avaliar a eficácia da LCc sobre a permeabilidade vascular no tecido periarticular de ratos submetidos hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina;
- ✓ Avaliar a participação da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e do fator de aceleração do decaimento (CD 55) na possível eficácia da LCc;
- ✓ Investigar o envolvimento de COX-2 na possível eficácia da LCc;
- ✓ Avaliar a participação dos receptores canabinoides na possível eficácia da LCc;
- ✓ Investigar o envolvimento das vias do NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>, opioide e HO-1 na possível eficácia da LCc;
- ✓ Investigar a eficácia da LCc sobre a coordenação motora de ratos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Alga Marinha

A alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium* foi coletada em rochas do meso-litoral, durante maré baixa (-0,2 a 0,2 m) na praia do Pacheco, localizada no município de Caucaia-Ceará. Posteriormente, a alga foi acondicionada em sacos plásticos e transportada em recipientes isotérmicos para o Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC). No laboratório, as algas foram lavadas para retirada de epífitas e/ou organismos incrustantes e estocada a -20 °C, para posterior utilização. Um exemplar da espécie foi identificado, e uma exsicata depositada no Herbário Prisco Bezerra sob o número 4977, na UFC (**Figura 6**).

**Figura 6-** Classificação taxonômica da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides*



**Filo:** *Chlorophyta* (alga verde)

**Classe:** *Caulerphyceae*

**Ordem:** *Caulerpales*

**Família:** *Caulerpaceae*

**Gênero:** *Caulerpa* (KAWL-er-puh) M. (Vahl) C. Agardh, 1817.

**Epíteto específico:** *cupressoides*

**Nome botânico:** *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. gardh

**Fonte:** Renata Line da C. Rivanor.

**Fonte:** JOLY, 1965.

##### 3.1.2 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (180-240 g; n=6/grupo) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos em sala com a temperatura ambiente controlada (24 °C), em um ciclo claro e escuro (12h/12h). Ração padrão e água foram disponibilizadas aos animais *ad libitum*. Para a determinação da atividade

hemaglutinante foram utilizados coelhos albinos (n=2) adultos e saudáveis. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. Os ensaios com os animais receberam a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UFC (CEPA nº 69/15) e seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança, respeitando o princípio dos 3 Rs da experimentação animal (“reduction, replacement and refinement”).

### **3.1.3 Células Sanguíneas**

Amostras de sangue (3-5 mL) foram obtidas de coelho albino através da via marginal do pavilhão auricular.

### **3.1.4 Soluções, Drogas e Reagentes**

Todos os reagentes que foram utilizados apresentavam grau de pureza e propriedades analíticas adequadas. As drogas e reagentes que foram utilizadas para a realização deste trabalho foram:

Para o isolamento e caracterização estrutural da LCc: tris (hidroximetil) aminometano e cloreto de sódio P.A., que foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). DEAE-Celulose, tripsina, heparina e mucina, que foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, U.S.A.).

Para a avaliação da LCc na hipernocicepção inflamatória na ATM de ratos: Albumina sérica bovina (BSA), Coomassie Brilliant Blue G-250. Álcool comercial, hematoxilina, eosina, violeta de genciana (Reagen), ácido clorídrico P.A (HCl), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), hidróxido de sódio (NaOH), ácido fosfórico P.A. (Synth, Brasil), ácido acético P.A, formaldeído P.A, Carbonato de Sódio (MERCK), cloreto de sódio (NaCl), acetato de sódio, isoflurano, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Tampão carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>); naloxona (Narcan®, Rhodia; São Paulo, SP, Brasil); cloridrato de morfina (Dimorf®, Cristália, Itapira, SP, Brasil); anticorpo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2 e ICAM-1 (abcam discover more); KIT ABC IgG de cabra (VECTASTAIN); zinco protoporfirina-IX (ZnPP-IX) (Sigma); Formalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), serotonina, capsaicina, carragenana; WIN 55, 212-2, AM281 e AM630 (caym- interprise comercio e servicos tecnologicos Ltda); Aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintetase induzida (NOSi); ODQ, inibidor da guanilil sintase (GC); KT5823, inibidor da proteína quinase G (PKG); Glibenclamida, bloqueador de canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> dependente. Composto

48/80. As drogas e reagentes foram solubilizados em salina estéril (0,9%, NaCl) ou água destilada ou em DMSO 4%.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Isolamento e Caracterização Parcial da Lectina da Alga Marinha Verde *C. cupressoides*

#### 3.2.1.1 Extração e Purificação da Lectina

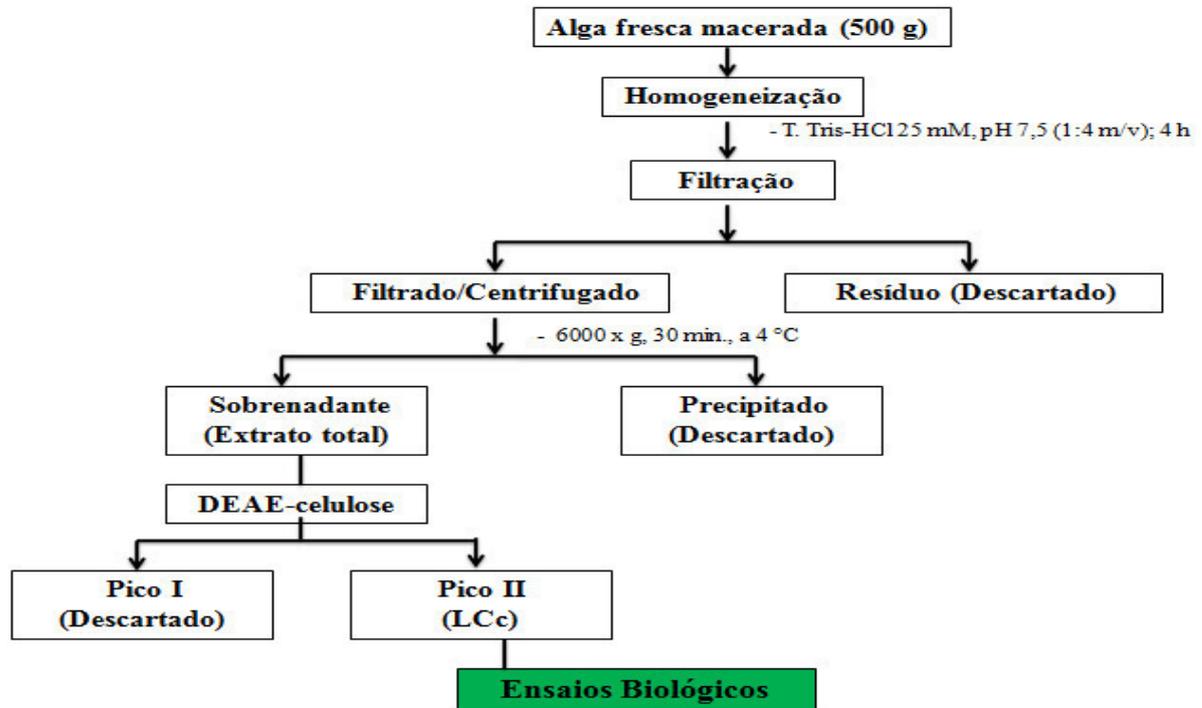
A lectina utilizada neste estudo foi obtida da alga marinha verde *C. cupressoides* (LCc), através da metodologia descrita por Benevides *et al.* (2001) com modificações realizadas por Rivanor *et al.* (2014).

Inicialmente, a alga estocada a -20 °C foi parcialmente seca e macerada em nitrogênio líquido. Em seguida, foi colocada em contato com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (TB), na proporção de 1:4 (m/v). Após agitação constante por 4 horas, o homogenato foi filtrado em tecido de nylon e em seguida centrifugado a 6.000 x g por 30min a 4 °C. O precipitado foi, então, descartado e o sobrenadante, dialisado exaustivamente contra água destilada e liofilizado, sendo denominado extrato total.

O extrato total obtido foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose, previamente equilibrada com TB. Após a completa eluição da fração não retida na coluna com TB, foi realizada a eluição da fração adsorvida na matriz por adição de NaCl 0,5 M ao tampão de equilíbrio. Durante o procedimento cromatográfico foi mantido um fluxo constante de 3 mL/tubo/min. A absorbância a 280 nm e a atividade hemaglutinante foram determinadas para cada tubo. A fração ativa (Pico II) foi reunida, dialisada contra água destilada, liofilizada e denominada de LCc (**Figura 7**).

Para a estimativa das concentrações de proteínas nos eluatos das cromatografias, foi utilizada a leitura de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro (Armstrong Biosciences Ultrospec 1100 pro).

**Figura 7– Esquema de extração e purificação da lectina da alga marinha verde *C. cupressoides* (LCc)**



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.2.1.2 Determinação da Atividade Hemaglutinante

Os ensaios de atividade hemaglutinante das frações proteicas obtidas por DEAE-celulose foram realizados através de diluições seriadas em tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 0,15 M. No primeiro tubo, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da amostra e uma série de diluições duplas foram realizadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.), sempre homogeneizando antes de cada transferência. A cada diluição foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de eritrócitos de coelho a 2% tratados com tripsina, a reação foi incubada à temperatura ambiente por 60min, conforme descrito por Ainouz *et al.* (1992). Posteriormente, os tubos foram centrifugados (2.000 x g, por 30s), e os resultados lidos macroscopicamente, sendo o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH/mL), que é o inverso da maior diluição da amostra que apresentar nítida aglutinação.

### 3.2.1.3 Espectro de Dicroísmo Circular (DC)

O espectro de DC foi realizado, principalmente, para a obtenção de dados da estrutura secundária da LCc, uma vez que, através dessa técnica, pode-se ter o conteúdo de  $\alpha$ -

hélices e folhas  $\beta$  de uma proteína. Além disso, a espectroscopia de DC é bastante utilizada para acompanhar a estabilidade de uma proteína submetida a diferentes temperaturas e pHs, pois os espectros da proteína enovelada e desnaturada são bem diferentes (NEHIRA *et al.*, 2012).

Todas as medidas de DC foram realizadas em espectropolarímetro Chirascan (Applied Photophysics, Reino Unido), em cubetas cilíndricas de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm. Os espectros foram observados no intervalo de 190-260 nm, sob N<sub>2</sub> constante, e recuperados empregando-se médias de 3 varreduras.

Os espectros originais foram tratados com Filtro de Fourier, preservando as bandas típicas de cada espectro e, em todos os casos, os espectros foram transformados em elipticidade molar ( $[\theta]$ ).

Para as análises de DC, a LCc foi diluída em tampão tris 25 mM (pH 7,5), em uma concentração final de 10  $\mu$ M. A contribuição do tampão utilizado foi subtraída, a fim de eliminar qualquer influência no resultado.

Para estimar a porcentagem de cada estrutura secundária da LCc ( $\alpha$ -hélice, folhas- $\beta$ , dobras e regiões desordenadas), os dados obtidos por DC, a 20 °C, foram analisados utilizando um servidor online K2D3 (LOUIS-JEUNE; ANDRADE-NAVARRO; PEREZ-IRATXETA, 2012).

Para avaliar a estabilidade térmica da LCc, a proteína foi submetida, por 10min, a diferentes temperaturas entre 20 e 100 °C, com intervalos de 10 °C.

### ***3.2.2 Investigação da Eficácia da LCc sobre a Hipernocicepção Inflamatória na ATM de Ratos***

#### ***3.2.3 Desenho Experimental***

A avaliação da eficácia da lectina na hipernocicepção inflamatória na ATM de ratos foi realizada através do tratamento dos animais com a LCc nas doses 0,1; 1 ou 10 mg/kg (i.v.), 30min antes dos agentes nociceptivos e inflamatórios. Os animais controle (Sham) foram tratados com solução salina estéril (0,9%). Morfina (5 mg/kg; s.c.) ou Indometacina (5 mg/kg; s.c.) foram utilizados como controle positivo.

### ***3.2.4 Injeções Intra-articulares***

Os animais foram anestesiados com isoflurano e receberam uma injeção do agente inflamatório (Formalina 1,5%/50  $\mu$ L, Serotonina (5-HT) 225  $\mu$ g/50  $\mu$ L, Capsaicina 1,5%/20  $\mu$ L ou Carragenana 100  $\mu$ g/25  $\mu$ L + 5-HT 75  $\mu$ g/25  $\mu$ L) (ROVERONI *et al.*, 2001; OLIVEIRA-FUSARO *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2006). Para administração desses agentes supracitados na ATM, uma agulha calibre 30G, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton (50  $\mu$ L) por um tubo de polietileno P50, foi inserida na porção inferior da borda póstero-inferior do arco zigomático da ATM esquerda, sendo avançada em direção anterior até contactar a região póstero-lateral do côndilo.

### ***3.2.5 Teste Comportamental***

As análises comportamentais foram realizadas durante a fase clara, entre 6h e 17h em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25 °C (ROSLAND, 1991). Durante o teste, os animais não tiveram acesso à água ou à comida. Cada animal foi previamente manipulado pelo o pesquisador por um período de 7 dias para habituar-se à manipulação experimental. Para a realização das análises comportamentais uma caixa de observação medindo 30x30x30 cm com base e 3 laterais espelhadas e frente de vidro foi utilizada. Cada animal foi inicialmente colocado e mantido na caixa por 10min para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse (ABBOTT *et al.*, 1986). Em seguida, o animal foi retirado da caixa de observação e previamente anestesiado por inalação de isoflurano para permitir as injeções na ATM dos agentes inflamatórios.

Os animais acordaram completamente 30s após a remoção do isoflurano e foram recolocados na câmara de observação, e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas. O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi quantificado através da utilização de um cronômetro, e o número de vezes que o animal levantou reflexamente a cabeça foi quantificado por um contador de células. Considerando que o ato de levantar reflexamente a cabeça segue um padrão uniforme de 1s de duração, a intensidade da resposta nociceptiva foi quantificada somando-se esse comportamento ao ato de coçar a região da ATM, como previamente padronizado (ROVERONI *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Imediatamente após as análises comportamentais, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (1 mL/100 g; i.p.) e eutanasiados por decapitação, e realizada a remoção do tecido periarticular.

#### 3.2.5.1 *Teste Formalina*

Os animais foram brevemente anestesiados por inalação com isoflurano e, em seguida, receberam uma injeção intra-articular de Formalina (1,5%, 50 µL) ou salina estéril 0,9% (50 µL) na ATM e então foram submetidos à análise comportamental durante 45min, divididos em 15 blocos de 3min para avaliar a resposta nociceptiva (ROVERONI *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Imediatamente após os testes comportamentais os animais foram anestesiados e eutanasiados.

Um grupo de animal recebeu morfina (5 mg/kg; s.c.) como controle positivo.

Além disso, participação do domínio lectínico foi avaliada pela incubação da lectina, por 12h a 37 °C (BENEVIDES *et al.*, 2001), associada ao açúcar ligante mucina (100 mg/kg) para garantir a ocupação do domínio lectínico, antes da administração i.v. nos animais. No grupo controle, o açúcar ligante foi incubado isoladamente nas mesmas condições.

A melhor dose da LCc obtida no teste da Formalina foi utilizada nos testes posteriores visando minimizar o número de animais utilizados.

#### 3.2.5.2 *Análise da Permeabilidade Vascular por Azul de Evans*

Após 30min do pré-tratamento com LCc os animais receberam tribromo (1%; i.p., 0,1 mL/100 g) (Hu *et al.*, 1990) e, em seguida, injeção intrarticular de Formalina (1,5%, 50 µL) na ATM. Todos os animais receberam uma dose de 50 mg/kg do corante Azul de Evans (1%; i.v.) (TORRES-CHÁVEZ *et al.*, 2011), imediatamente após a aplicação da Formalina na ATM, e após 45min os animais foram eutanasiados. Como o corante Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas, o local da injeção foi identificado visualmente, de acordo com a aparência do corante extravasado (HAAS *et al.*, 1992), permitindo assim a remoção adequada dos tecidos periarticulares para análise do extravasamento plasmático através de técnicas espectrofotométricas.

Para a extração do corante, o tecido periarticular de cada animal foi pesado e imerso em diferentes microtubos contendo 1 mL de formamida mantidos a 60 °C por 24h

(FIORENTINO *et al.*, 1999). Após a extração, a quantidade de corante extravasada no tecido foi determinada em um leitor de microplacas que mediu a absorbância das diferentes soluções de formamida (620 nm) simultaneamente. Os resultados dessas leituras foram comparados com os resultados de leituras correspondentes a soluções com quantidades conhecidas do corante Azul de Evans (curva de calibração com 4 µg, 2 µg, 1 µg e 0,5 µg de corante por mL de formamida). Finalmente, a quantidade de corante extravasada (µg) em cada solução foi dividida pelo peso (g) do respectivo tecido incubado. Dessa forma, o extravasamento foi calculado em micrograma de corante por grama de tecido dissecado.

### 3.2.5.3 Participação de Grânulos Mastocitários na Eficácia da LCc

É descrito na literatura que a Formalina induz a degranulação de mastócitos quando injetada na região orofacial, sendo uma das primeiras alterações histológicas observadas (CLAVELOU *et al.*, 1995). Dessa forma decidimos avaliar a participação dos grânulos mastocitários no efeito da LCc.

Para isso utilizamos o composto 48/80 que é responsável pela degranulação de mastócitos e consequente liberação de histamina e serotonina presente em seus grânulos (BRITO *et al.*, 2007). Para induzir depleção de mastócitos, o composto 48/80 foi administrado durante quatro dias (0,6 mg/kg nos três primeiros dias e 1,2 mg/kg no 4º dia) por via intraperitoneal (i.p.) (FEITOSA *et al.*, 2002). No 5º dia, a hipernocicepção inflamatória foi induzida por Formalina (1,5%/50 µL) na ATM dos animais tratados ou não-tratados com composto 48/80. A LCc (10 mg/kg; i.v.) foi administrada 30 min antes da injeção de Formalina.

### 3.2.5.4 Dosagem das Citocinas TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$

Amostras do tecido periarticular foram obtidas e homogeneizadas em solução RIPA (Santa Cruz USA). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10.000 RPM/10min/4 °C), e o sobrenadante utilizado para quantificar as citocinas pro-inflamatórias TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , realizada pelo método de ELISA, usando o Kit (R&D Systems®, Kit Quantikine\_rat TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  immunoassay), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, a placa de 96 poços foi incubada por 2h à temperatura ambiente com 50 µL/poço com as soluções padrão, amostra e controle e com o diluente de ensaio RD1-54 para TNF $\alpha$ , e IL-1 $\beta$ . Posteriormente, a placa foi lavada quatro vezes com 400 µL de tampão de

lavagem e incubada novamente por mais 2h com 100  $\mu$ L de conjugado de IL-1 $\beta$  por poço. Após esse período, a placa foi novamente lavada e incubada por mais 30min com 100  $\mu$ L da solução substrato, sendo a placa protegida da luz. Em seguida, 100  $\mu$ L da solução de parada foram adicionados em cada poço e a absorbância medida a 450 nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

### 3.2.5.5 Detecção Proteica de ICAM-1, CD55 e COX-2

#### 3.2.5.5.1 Extração de Proteínas

Os tecidos periarticulares foram macerados com auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido. O produto desse processo foi inserido em microtubo contendo 200  $\mu$ L de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (SigmaAldrich, EUA, 1  $\mu$ L de inibidor de protease: 100  $\mu$ L de RIPA). Em seguida, as amostras foram vortexadas por 30s, a cada 10min por 30min, e centrifugadas (17min, 4 °C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

#### 3.2.5.5.2 Dosagem de Proteína

As proteínas foram dosadas pelo método do ácido bicinonínico, e foi realizado conforme descrito pelo fabricante (Thermo Scientific, Estados Unidos, EUA). De acordo com este método, as proteínas presentes nas amostras reduzem o cobre da sua forma cúprica ( $\text{Cu}^{2+}$ ) para a cuprosa ( $\text{Cu}^{1+}$ ). Este se liga a duas moléculas de ácido bicinonínico, resultando na cor púrpura visualizada no final da reação. Inicialmente, a proteína foi diluída (1  $\mu$ L de proteína: 20  $\mu$ L de RIPA) e preparado 75  $\mu$ L de proteína diluída. Em seguida, misturou-se o reagente A (contém ácido bicinonínico) e B (contém cobre), respectivamente na proporção de 50:1. Posteriormente, colocaram-se em duplicata 25  $\mu$ L de cada amostra diluída e 200  $\mu$ L da mistura final do reagente A e B em placa de 96 poços. Posteriormente, a placa foi incubada por 30min a 37 °C em estufa. Por fim, efetuou-se a leitura da reação em leitor de Elisa a 562 nm. Para a curva, foram utilizadas concentrações conhecidas de Albumina sérica bovina (BSA): 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0  $\mu$ g/mL.

### 3.2.5.5.3 Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 20 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mercaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10s, aquecendo no banho maria (95°C, 5min) e centrifugando (10000 rpm, 4 °C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 v para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% ICAM-1; CD55 e COX-2 e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 v por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4 °C sob agitação constante, com os anticorpos anti-ICAM-1 (Abcam, 1:100), anti-CD55 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100), anti-COX-2 (Abcam, 1:500) ou anti-α-tubulin (Millipore, EP1123Y, 1:500) diluídos em 1% de BSA em TBST. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10min cada com TBST. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit (Invitrogen, 656120, 1:1000) ou HRP-rabbit anti-goat (Invitrogen, A16142, 1:1000) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas três vezes, duração de 10min cada, com TBST. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad, EUA) ou expostas a filme radiográfico.

### 3.2.5.6 Teste da Carragenana

Para confirmar que LCc exerce um papel anti-inflamatório na ATM, os animais receberam uma injeção intra-articular de Carragenana (100 µg/25 µL), um recrutador de neutrófilos, 30min antes do tratamento com LCc (10 mg/kg, i.v.). A hipernocicepção

inflamatória induzida por Carragenana foi avaliada através das respostas comportamentais nociceptivas induzidas pela aplicação intra-articular de uma baixa dose de 5-hidroxitriptamina (5-HT, 75 µg/25 µL) 1h após a injeção de Carragenana (OLIVEIRA *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2006).

Todos os animais receberam um volume total de 50 µL de soluções em sua ATM. Depois da injeção de 5-HT na ATM, o comportamento nociceptivo foi avaliado durante 30min (RODRIGUES *et al.*, 2006). Posteriormente, os animais foram eutanasiados, e realizado a remoção do tecido periarticular para detecção de COX-2 através de western blotting.

#### 3.2.5.7 *Teste da Serotonina (5-HT)*

Grupos de animais receberam por via (i.v.), 30min antes da indução da hipernocicepção, LCc (10 mg/kg), salina estéril (0,9%) ou indometacina (5 mg/kg; s.c.).

Para verificar se o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de LCc na ATM é mediada pela inibição de prostanoídes e liberação de aminas simpáticas, os animais foram anestesiados por inalação com Isoflurano e, em seguida, receberam uma injeção intra-articular de 5-HT (225 µg/art.; 50 µL) na ATM esquerda (OLIVEIRA-FUSARO *et al.*, 2012). O grupo Sham recebeu solução salina estéril 0,9% no mesmo volume na ATM esquerda.

Após a injeção intra-articular de 5-HT, o comportamento nociceptivo foi mensurado durante 30min, dividido em 10 blocos de 3min (ROVERONI *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Em seguida, os animais foram eutanasiados, e o tecido periarticular coletado e armazenado em freezer a -80 °C para posteriores análises.

#### 3.2.5.8 *Teste da Capsaicina*

Para testar se LCc induz antinocicepção na ATM via inibição de fibras C primárias, grupos de animais receberam uma injeção intra-articular de Capsaicina (1,5%, 20 µL) 30min após o tratamento com LCc (10 mg/kg, i.v.) ou salina estéril (0,9%). O grupo Sham recebeu solução salina estéril 0,9% no mesmo volume na ATM esquerda.

Após a injeção de Capsaicina as respostas comportamentais foram quantificadas durante 30min, dividido em 10 blocos de 3min (ROVERONI *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Imediatamente após as análises comportamentais, os animais foram eutanasiados, e o tecido periarticular coletado e armazenado em freezer a -80 °C para posteriores análises.

### **3.2.6 Avaliação do Envolvimento da Via dos Canabinoides**

Para avaliar se os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatório de LCc estão envolvidos na ativação da via dos canabinoides, um grupo de animais foram pré-tratados com os antagonistas seletivos dos receptores CB1 e CB2.

AM 281 (antagonista CB1; 3 mg/kg, i.p.) ou AM 630 (antagonista CB2; 3 mg/kg, i.p.), assim como o veículo (DMSO 4%), foram administrados 10 min antes da injeção intravenosa da LCc (10 mg/kg), e, após 30min, houve administração intra-articular de Formalina (1,5%/50 µL). Outro grupo de animais foram tratados com WIN 55, 212-2 (1 mg/kg, i.p.), agonista dos receptores canabinoides, 30min antes da indução da hipernocicepção inflamatória (BURGOS *et al.*, 2010; GONDIM *et al.*, 2012).

### **3.2.7 Análise do Envolvimento da Via Opioide no Efeito Antinociceptivo da LCc**

No intuito de avaliar se o efeito antinociceptivo da LCc (10 mg/kg; i.v.) está envolvido na ativação do sistema opioide central, foi realizada a injeção intratecal (i.t.) do antagonista opioide naloxona (15 µg/i.t.; 10 µL) 15min antes da injeção da LCc (10 mg/kg) ou morfina (5 mg/kg; s.c.).

O animal foi previamente anestesiado por inalação de isoflurano para permitir a injeção (i.t.). Sob anestesia, os animais ficaram posicionados em decúbito ventral, de forma que o espaço suboccipital foi facilmente encontrado. Uma agulha de calibre 30, conectada a uma seringa Hamilton de 50 µL através de uma cânula de polietileno foi utilizada na injeção. Primeiramente a agulha foi inserida logo abaixo do osso occipital penetrando a pele sobre o espaço suboccipital até quatro milímetros de profundidade e em seguida foi levemente inclinada em direção cranial. A agulha foi então avançada mais dois milímetros para perfurar a membrana atlanto-occipital e atingir o espaço subaracnoide bulbar. Esta técnica permitiu a administração direta da naloxona no líquido cerebrospinal nos arredores do subnúcleo caudal trigeminal. O volume total da injeção intratecal foi de 10 µL e administrada a uma velocidade de 1 µL/s, como previamente padronizado (FISCHER *et al.*, 2005).

Após o período de 45min, os grupos de animais tratados receberam uma injeção intra-articular de Formalina (1,5%, 50 µL) e, em seguida, as respostas comportamentais foram mensuradas (ROVERONI *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

### ***3.2.8 Avaliação do Envolvimento da Via NO/GMP<sub>c</sub>/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> dependente sobre o Efeito Antinociceptivo da LCc***

Para determinar se os efeitos da LCc sobre a hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina na ATM depende da via NO/GMP<sub>c</sub>/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>, foram utilizadas drogas que atuam na via, previamente à administração da lectina.

#### ***3.2.8.1 Grupos Experimentais***

Os animais foram divididos em onze grupos, sendo cada um composto por seis animais:

Grupo Sham: O grupo recebeu (i.v.) o veículo (salina 0,9%), seguido 30min após da injeção (i.art.) de salina estéril 0,9% (50 µL);

Grupo Formalina: O grupo recebeu (i.v.) o veículo (salina 0,9%), seguido 30min após da injeção (i.art.) Formalina (1,5%/50 µL);

Grupos LCc: Os grupos receberam (i.v.) LCc (10 mg/kg), seguido 30min após da injeção (i.art.) Formalina (1,5%/50 µL);

Grupo Aminoguanidina + LCc: O grupo recebeu (i.p.) Aminoguanidina (30 mg/kg), inibidor seletivo da NO sintetase induzida (NOSi), diluído em solução salina estéril (0,9%), após 30 min receberam (i.v.) LCc (10 mg/kg), seguido 30min após da injeção (i.art.) Formalina (1,5%/50 µL);

Grupo Aminoguanidina: O grupo recebeu (i.p.) Aminoguanidina (30 mg/kg) diluído em solução salina estéril (0,9%), após 30min receberam injeção (i.art.) Formalina (1,5%/ 50µL);

Grupo ODQ + LCc: O grupo recebeu (s.c.) ODQ (5 mg/kg) inibidor da guanilil sintase (GC) - enzima que catalisa reação para formação de GMP<sub>c</sub>, diluído em DMSO 3% e solução salina estéril (0,9%) após 30min receberam (i.v.) LCc (10 mg/kg), seguido 30min após da injeção (i.art.) Formalina (1,5%/50 µL);

Grupo ODQ: O grupo recebeu (s.c.) ODQ (5 mg/kg) diluído em DMSO 3% e solução salina estéril (0,9%) após 30min receberam a injeção (i.art.) Formalina (1,5%/50 µL);

Grupo KT5823 + LCc: O grupo recebeu (s.c.) KT5823 (4 µg/mL) inibidor da proteína quinase G (PKG), diluído em solução salina estéril (0,9%); após 30min receberam (i.v.) LCc (10 mg/kg), seguido 30min após da injeção (i.art.) Formalina (1,5%/50 µL);

Grupo KT5823: O grupo recebeu (s.c.) KT5823 (4 µg/mL) diluído em solução salina estéril (0,9%); após 30min receberam a injeção (i.art.) Formalina (1,5%/50 µL);

Grupo Glibenclamida + LCc: O grupo recebeu (i.p.) Glibenclamida (10 mg/kg) bloqueador de canais de  $K^+_{ATP}$  - dependente, diluído em solução salina estéril (0,9%), após 30min receberam LCc (10 mg/kg), seguido 30min após da injeção (i.art.) Formalina (1,5%/50 µL).

Grupo Glibenclamida: O grupo recebeu (i.p.) Glibenclamida (10 mg/kg) diluído em solução salina estéril (0,9%), após 30min receberam a injeção (i.art.) Formalina (1,5%/50 µL).

Após a injeção (i.art.) de Formalina as respostas comportamentais foram quantificadas durante 45min. (ROVERONI *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Imediatamente, após esse período os animais foram eutanasiados.

### **3.2.9 Participação da Via da HO-1**

Para avaliar o possível envolvimento da Via da HO-1 no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de LCc, um grupo de animais foram pré-tratados com zinco protoporfirina (ZnPP IX) (3 mg/kg; s.c.), inibidor seletivo da HO-1, diluído em solução tampão carbonato de sódio ( $Na_2CO_3$ ) 50 mM, 30min antes da injeção intravenosa da LCc (10 mg/kg).

Após 30min da injeção de LCc, os grupos de animais tratados receberam uma injeção intra-articular de Formalina (1,5%/50 µL) e, em seguida, as respostas comportamentais foram quantificadas (ROVERONI *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

### **3.2.10 Determinação da Eficácia da LCc na Coordenação Motora de Ratos através do Teste do Rota rod**

O teste do *Rota Rod* mede o efeito do relaxamento muscular ou desordem da coordenação motora ocasionada pela ação de drogas em animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Os animais foram selecionados 24h antes do experimento, sendo eliminados aqueles que não permaneceram no aparelho de rota rod durante, pelo menos, dois períodos consecutivos de 60s cada. Ratos foram colocados com as quatro patas sobre uma barra giratória (4 a 40 rpm) separada por amplas abas que possibilitam a análise comportamental de cada animal. Os ratos foram tratados i.v. com LCc ou salina estéril (0,9%), 30min antes da injeção intra-articular de Formalina (1,5%/50 µL) ou salina estéril (0,9%). Após 45min o

tempo de permanência do animal foi registrado no aparelho por um período de 5min (DUNHAM; MIYA, 1957; PIEL, 2014).

### ***3.2.11 Análise Estatística***

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e, quando observado diferenças significativas entre as médias, foi aplicado o pós-teste de Bonferroni. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Espectro de Dicroísmo Circular

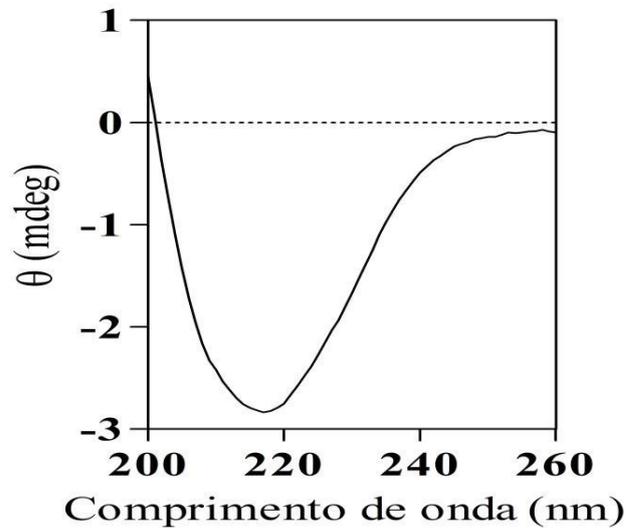
A técnica de dicroísmo circular (DC) é uma ferramenta importante utilizada na caracterização de proteínas e especificamente para determinação de estruturas secundárias (GONDIM *et al.*, 2017). Baseia-se na absorção diferenciada da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda por cromóforos que, ou possuem quiralidade intrínseca, ou são colocados em ambientes quirais. Estruturas secundárias, como  $\alpha$ -hélice, folhas- $\beta$  e estruturas helicoidais aleatórias apresentam sinais na região do ultravioleta distante (180 a 250 nm), que correspondem à absorção da ligação peptídica, assim o espectro de DC pode ser analisado para fornecer informações dessas estruturas (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

O formato da curva do espectro e os comprimentos de onda máximo e mínimo de emissão fornecem informações estruturais da proteína. Dessa forma, os picos presentes na faixa de comprimento de onda de 200-250 nm são geralmente característicos de um espectro em forma de “W”, com picos em torno de 222 e 208 nm, sendo indicativo da presença de estruturas em  $\alpha$ -hélice. Já um espectro em forma de “V”, com pico em torno de 217-220 nm, indica a presença de estruturas em folha- $\beta$  (RANJBAR; GILL, 2009).

O espectro da estrutura secundária da lectina da *C. cupressoides*, em condições nativas (20 °C), mostrou uma curva em forma de “V”, com pico em torno de 220 nm, sugerindo uma predominância de conformação  $\beta$  em sua estrutura secundária. A análise através do servidor online K2D3, mostrou que a referida lectina é composta por 4% de  $\alpha$ -hélice, 38% de folhas- $\beta$  e 58% de regiões desordenadas (**Figura 8**).

Estudos de estrutura secundária, por DC, de lectinas de algas marinhas apresentaram resultados semelhantes ao observado para a LCc. A lectina da alga *A. multifida* (Rhodophyta), quando analisada por DC, também mostrou um perfil espectroscópico característico de folhas- $\beta$  (MESQUITA, 2010). Recentemente, mostrou-se, por espectroscopia de DC, que a lectina da *S. filiformis* (Rhodophyta) é composta por 9% de  $\alpha$ -hélice, 39% de folhas- $\beta$ , 22% de dobras e 30% de regiões desordenadas, demonstrando também, nessa estrutura, uma predominância de folhas- $\beta$ , em detrimento de  $\alpha$ -hélices (ABREU, 2016b). Já ensaios de DC para BTL-2, uma das isoformas da lectina da alga *B. triquetrum*, revelaram a presença majoritária de estruturas aleatórias e um baixo conteúdo de  $\alpha$ -hélice e folhas- $\beta$  (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

**Figura 8- Espectro da estrutura secundária da LCc em condições nativas**



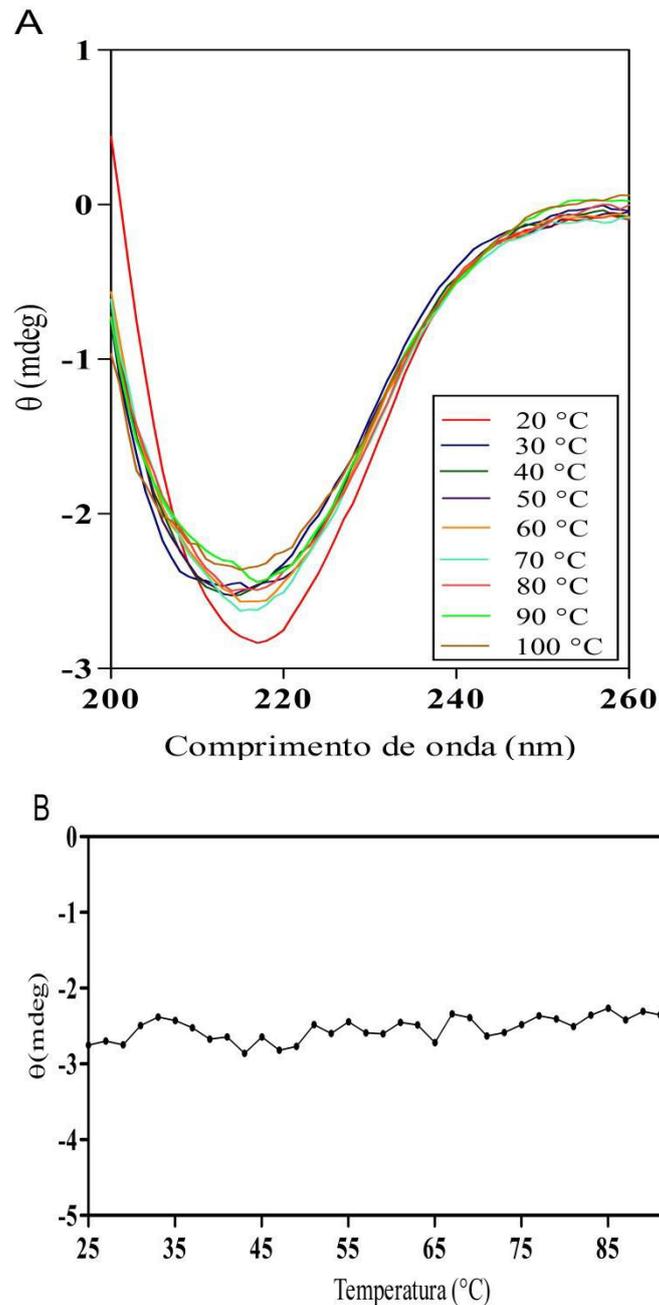
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

As medidas de dicroísmo circular foram obtidas usando um espectropolarímetro Chirascan, com célula de 0,1 cm de caminho óptico. A LCc foi diluída em tampão Tris 25 mM, pH 7,5, para uma concentração final de 10  $\mu$ M. A análise foi realizada a 20  $^{\circ}$ C.

A técnica de DC também é bastante utilizada para acompanhar a termoestabilidade de proteínas, visto que os espectros das proteínas enoveladas e desnaturadas são bem diferentes (NEHIRA *et al.*, 2012).

Na avaliação da estabilidade térmica, LCc foi aquecida em diferentes temperaturas (20 a 100  $^{\circ}$ C), monitorada pelo sinal DC no comprimento de onda 260 nm. O DC mostra que a LCc é uma proteína resistente ao aquecimento, e mesmo sendo submetida a altas temperaturas (100  $^{\circ}$ C), não houve alteração na forma da curva do seu espectro (**Figura 9A**). Esses dados foram confirmados pelo gráfico de desnaturação térmica ilustrado na **Figura 9B**, no qual pode-se observar que não ocorreu desnaturação das moléculas de proteínas presentes na solução.

**Figura 9- Efeito da temperatura sobre a estrutura secundária da LCc**



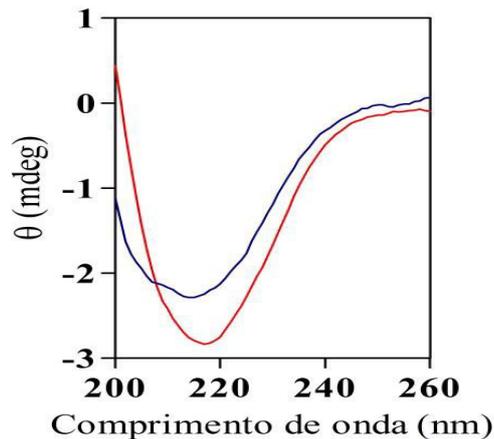
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

As medidas de dicroísmo circular foram obtidas usando um espectropolarímetro Chirascan, com célula de 0,1 cm de caminho óptico, em tampão Tris 25 mM, pH 7,5, para uma concentração final de 10  $\mu$ M. A estabilidade térmica da lectina foi avaliada através de espectros coletados a cada 10 °C, de 20 a 100 °C, com uma aquisição a cada temperatura.

Além disso, após a análise da estabilidade térmica, realizamos uma nova leitura do espectro da estrutura da LCc (20 °C) e comparamos com o espectro obtido em condições nativas (**Figura 10**). Ao analisar os dados de DC no servidor online K2D3, nenhuma mudança significativa na conformação secundária dessa lectina foi observada, confirmando

que LCc preserva sua estrutura e não adquire conformação típica de proteínas desenoveladas pelo efeito da temperatura (**Tabela 1**).

**Figura 10- Espectro da estrutura secundária da LCc em condições nativas e após o aquecimento**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

As medidas de dicroísmo circular foram obtidas usando um espectropolarímetro Chirascan, com célula de 0,1 cm de caminho óptico. A LCc foi diluída em tampão Tris 25 mM, pH 7,5, para uma concentração final de 10  $\mu$ M. A análise foi realizada a 20 °C (—) e após ser submetida a altas temperaturas (—).

**Tabela 1. Elementos de estrutura secundária da Lectina da *C. cupressoides***

Amostra	Estrutura Secundária (%)		Estruturas não ordenadas (%)
	$\alpha$ -hélice	folhas- $\beta$	
LCc (Nativo)	4,0	38,0	58,0
LCc	3,3	38,0	58,7

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Esses dados corroboram com os obtidos por Benevides *et al.* (2001). Neste trabalho, os autores avaliaram o efeito da temperatura na atividade hemaglutinante da lectina da *C. cupressoides*. A atividade hemaglutinante manteve-se estável quando a lectina foi submetido até 70 °C, decrescendo 50% a 80 °C e, mesmo com uma temperatura de 90 °C, LCc conseguiu apresentar 25% de sua atividade. Portanto, LCc revelou-se uma proteína termoestável que retém a sua estrutura, bem como sua atividade de hemaglutinação.

Lectinas de algas marinhas, em geral, apresentam moderada termoestabilidade, e essa característica as tornam proteínas atraentes para fins biotecnológicos (ROGERS; HORI,

1993; GODIM *et al.*, 2017). Como por exemplo, as lectinas das algas marinhas vermelhas *Vidalia obtusiloba* e *Pterocladella capillacea* que, quando submetidas a elevadas temperaturas, permaneceram estáveis até as temperaturas de 70 e 60 °C, respectivamente (MELO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Além disso, a predominância da estrutura em folhas- $\beta$  e a alta estabilidade térmica observada para LCc, sugerem semelhanças entre as lectinas de leguminosas, principalmente com as do gênero *Dioclea*, como a *Dioclea sclerocarpa* e *Dioclea lasiocarpa* (GONDIM *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Conhecer a estrutura das lectinas é importante para tentar compreender as diferentes atividades biológicas relacionadas a essas proteínas. No entanto, em contraste com as lectinas de plantas terrestres superiores, as lectinas de algas marinhas são isoladas e caracterizadas a um ritmo mais lento desde o primeiro relato de atividade hemaglutinante (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012).

Assim, embora alguns estudos sobre lectinas de algas marinhas tenham sido relatados, poucas lectinas foram caracterizadas em detalhes (WANG *et al.*, 2004; NAGANO *et al.*, 2002), especialmente no campo estrutural e molecular. Algumas lectinas de algas tiveram a sequência de aminoácidos estudada, as primeiras estruturas primárias elucidadas foram as lectinas das algas marinhas vermelhas *B. triquetrum* e *Hypnea japonica* (CALVETE *et al.*, 2000; HORI; MATSUBARA; MIYAZAWA, 2000), posteriormente a estrutura primária da lectina da alga verde *Ulva pertusa* também foi identificada (WANG *et al.*, 2004). Nagano *et al.* (2005a) caracterizaram a estrutura primária de duas lectinas isoladas das algas marinhas vermelhas *H. cervicornis* e *H. musciformis* e, identificaram que essas lectinas são proteínas homólogas que pertencem a uma nova família de proteínas.

A caracterização desses genes de lectina pode ajudar os pesquisadores a compreender melhor a diferença entre as lectinas de plantas terrestres e as lectinas de algas marinhas. Várias evidências indicam que a grande maioria das lectinas de plantas terrestres conhecidas podem ser classificadas dentro de quatro grandes e três pequenas famílias de proteínas estruturalmente e evolutivamente relacionadas (AMBROSIO *et al.*, 2003). Curiosamente, as estruturas primárias de lectinas de algas estudadas até o momento não mostram similaridade de sequência com qualquer outra lectina de plantas conhecida, indicando que essas lectinas pertencem a uma nova família de proteínas (NAGANO *et al.*, 2005a).

Como podemos observar mesmo o número de trabalhos de caracterização estrutural de lectinas de macroalgas tenha aumentado, ainda há dificuldades na classificação

destas proteínas, pois as informações existentes estão restritas a poucas espécies sendo mais concentradas nas algas vermelhas (ZIÓŁKOWSKA; WLODAWER, 2006).

## **4.2 Eficácia da LCc sobre a Hipernociceção Inflamatória na ATM de Ratos**

### ***4.2.1 Eficácia da LCc na Hipernociceção Inflamatória Induzida por Formalina na ATM de Ratos***

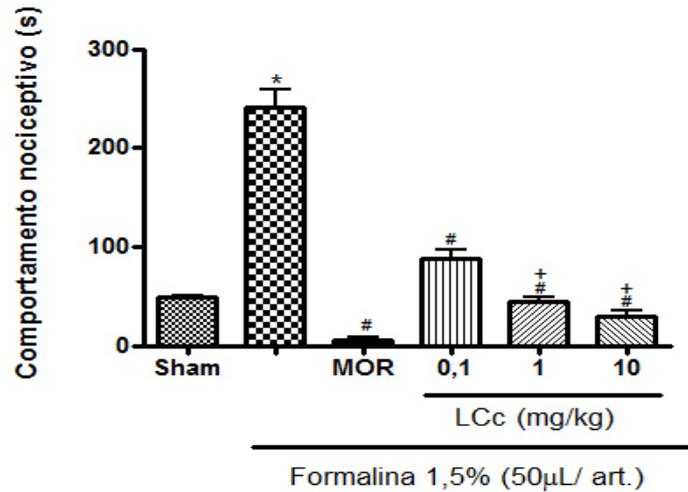
A injeção intra-articular (50  $\mu$ L/art.) de Formalina 1,5% na ATM de ratos aumentou significativamente [241  $\pm$  17s] o comportamento nociceptivo, caracterizado pelo ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça, comparado ao grupo salina [48,4  $\pm$  2,3s].

Os grupos de animais que receberam o pré-tratamento com LCc (0,1; 1 e 10 mg/kg; i.v.), administrada 30min antes da injeção de Formalina, reduziram significativamente o comportamento nociceptivo, apresentando percentuais de redução em 63,5 [88  $\pm$  9s], 82 [44  $\pm$  5s] e 90% [24  $\pm$  5s], respectivamente, quando comparados ao grupo Formalina [241  $\pm$  17s]. O grupo controle positivo, morfina (5 mg/kg; s.c.), também reduziu significativamente [5  $\pm$  3s] o ato de coçar a região da ATM e levantar reflexamente a cabeça durante o teste (**Figura 11**).

Embora as doses de 1 e 10 mg/kg não tenham apresentado diferença significativa entre si, optamos por trabalhar com a dose de 10 mg/kg, tendo em vista que essa dose apresentou uma potente ação anti-inflamatória em estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, praticamente zerando o influxo celular no lavado sinovial em 98,5% (295,5  $\pm$  155,6 células/mm<sup>3</sup>) na artrite induzida por Zy (19494  $\pm$  241 células/mm<sup>3</sup>) na ATM de ratos.

Com relação ao efeito inflamatório, a aplicação de Formalina (1,5%/ 50  $\mu$ L) na ATM promoveu um aumento significativo na permeabilidade vascular [70  $\pm$  8  $\mu$ g de azul de Evans/mg de tecido/mL] em relação ao grupo salina [15  $\pm$  2  $\mu$ g de azul de Evans/mg de tecido/mL]. O pré-tratamento (30min) com LCc (10 mg/kg) reduziu ( $p < 0,05$ ) a permeabilidade vascular em 67% [23  $\pm$  2  $\mu$ g de azul de Evans/mg de tecido] quando comparado ao grupo Formalina (**Figura 12**).

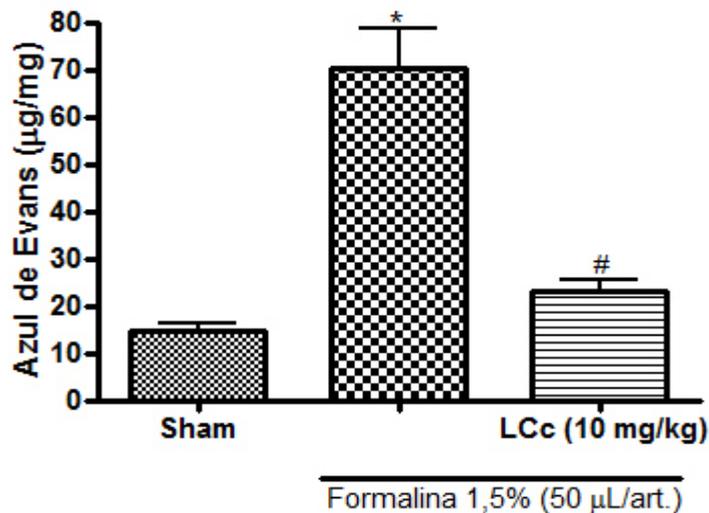
**Figura 11- Eficácia da LCc no comportamento nociceptivo induzido por Formalina na ATM de ratos**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Formalina (1,5%/ 50 μL) ou solução salina foi injetada i.art. na ATM esquerda dos ratos. Morfina (MOR) (5 mg/kg) foi administrado s.c. 30min antes do estímulo. Os animais receberam solução salina 0,9% (i.v.) ou LCc (0,1, 1 e 10 mg/kg; i.v.). Os dados estão expressos como média ± E.P.M. de seis animais por grupo. # p<0.05 indica diferença estatística em relação ao grupo Sham. \* p<0.05 indica diferença estatística em relação ao grupo Formalina. + p<0,05 indica diferença estatística em relação ao grupo LCc 0,1. (ANOVA, Teste de Bonferroni).

**Figura 12- Avaliação da eficácia da LCc na permeabilidade vascular sobre a hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os animais foram tratados com LCc (10 mg/kg; i.v.) ou Salina estéril 0,9% 30min antes da injeção intra-articular de Formalina a 1,5% (50 μL/art.). Todos os animais receberam uma dose de 50 mg/kg do corante Azul de Evans (1%; i.v.) imediatamente após a aplicação da Formalina. Após 45min o tecido periarticular de cada animal foi coletado. As barras representam a média ± E.P.M. de seis animais por grupo. \* p < 0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo Sham. # p < 0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo Formalina. (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Uma das características do teste da Formalina é o seu padrão bifásico. A primeira fase (neurogênica) é gerada na periferia por ativação de neurônios nociceptivos por ação direta da Formalina no receptor de potencial transiente de canal de cátion, subfamília A, membro 1 (TRPA1) (MCNAMARA *et al.*, 2007; FISCHER; TAMBELI; PARADA, 2008), que é altamente expressado por um subconjunto de nociceptores de fibras-C (KOBAYASHI *et al.*, 2005), enquanto que a segunda fase (inflamatória) ocorre mais tardiamente devido à inflamação decorrente da liberação de mediadores inflamatórios como a serotonina e histamina dos mastócitos, no qual estimula sinergicamente os neurônios aferentes primários nociceptivos via receptor de Serotonina tipo 3 e receptor de histamina tipo 1, respectivamente (TING *et al.*, 2007; FISCHER; TAMBELI; PARADA, 2008).

Com relação à região orofacial, o teste da Formalina é um dos testes pré-clínicos mais bem estabelecidos para investigar a eficácia de compostos analgésicos (LUCCARINI *et al.*, 2006). Roveroni *et al.* (2001) propuseram o teste da Formalina na ATM, entretanto, nesse modelo só é possível observar a fase inflamatória, devido à necessidade de induzir a anestesia no animal para permitir a injeção intra-articular. No entanto, sabe-se que a resposta tardia melhor caracteriza a dor (evidente) e tem mais semelhança com dor clínica do que a provocada por um estímulo transiente (ROVERONI *et al.*, 2001).

Além disso, a injeção de Formalina na região orofacial libera diferentes mediadores como a bradicinina, citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8), aminas simpáticas e prostaglandinas (PG), contribuindo de forma significativa para a dor inflamatória (PADI *et al.*, 2006; CHICHORRO *et al.*, 2004). Provoca também danos nos tecidos através da degranulação de mastócitos, liberando serotonina e histamina, uma das primeiras alterações histológicas, assim como extravasamento granulócito (CLAVELOU *et al.*, 1995).

Existem alguns trabalhos com polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marinhas com ação anti-inflamatória e antinociceptiva na região orofacial (COURA *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2017). Entretanto, o presente estudo é o primeiro a relatar a eficácia e mecanismo de ação de uma lectina de alga marinha na hipernocipção inflamatória induzida por Formalina na ATM de ratos. Além disso, essa lectina foi a primeira investigada nas DTMs.

Esses resultados corroboram com estudos encontrados na literatura para LCc, Rivanor *et al.* (2014) mostraram que essa lectina reduz a hipernocicepção mecânica, o influxo celular e a atividade da mieloperoxidase (MPO) no lavado sinovial da ATM de ratos com artrite induzida por Zy. Além disso, já foram reportados os efeitos antinociceptivo e anti-

inflamatório dessa lectina em modelos clássicos de nocicepção em camundongos (teste de contorção, teste de Formalina e placa quente) e inflamação aguda em ratos (edema de pata) (VANDERLEI *et al.*, 2010; DE QUEIROZ *et al.*, 2015).

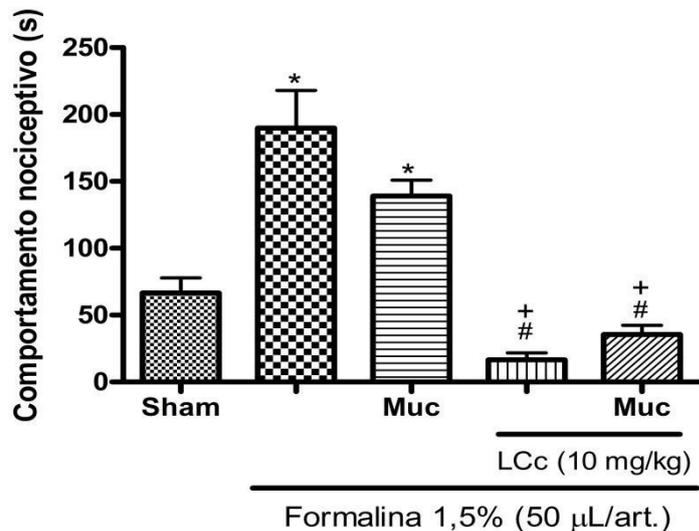
Estudo realizado por De Queiroz *et al.* (2015) mostrou que o efeito anti-inflamatório da LCc pode estar relacionado com os eventos vasculares da inflamação, envolvendo possivelmente a supressão da liberação de alguns mediadores pelos mastócitos, tais como histamina, uma vez que o tratamento com essa proteína (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/kg) inibiu significativamente, ao longo de todo período avaliado (30min, 1, 2, 3 e 4h), o edema osmótico induzido por dextrana na pata de ratos. Esses dados corroboram com os resultados obtidos nesse estudo, no qual LCc foi capaz de reduzir o aumento da permeabilidade vascular.

A literatura descreve que as lectinas das algas vermelhas *P. capillacea*, *H. cervicornis* e *S. filiformis* também possuem efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório em modelos clássicos de dor e inflamação (SILVA *et al.*, 2010; BITENCOURT *et al.*, 2008; ABREU *et al.*, 2016a). Figueiredo *et al.* (2010) demonstraram que a lectina da alga marinha vermelha *H. musciformis* possui efeito anti-hipernociceptivo em modelos de hipernocicepção inflamatória induzida por carragenana, ovalbumina e prostaglandinas E<sub>2</sub> na pata de ratos, e que esse efeito foi associado à inibição da migração neutrofílica observado através da diminuição da atividade da mieloperoxidase e ao aumento da produção de óxido nítrico.

Dados semelhantes aos nossos resultados foram obtidos para uma fração polissulfatada (1, 3, ou 9 mg/kg; s.c.) da alga marinha vermelha, *Gracilaria cornea* (Gc-FI), a qual foi capaz de reduzir a hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina na ATM de ratos (COURA *et al.*, 2017). Em concordância com esses resultados, Araújo *et al.*, (2017), utilizando o mesmo modelo supracitado, verificaram uma diminuição do comportamento nociceptivo dos animais tratados com a fração polissacarídica FII (0,03, 0,3 ou 3,0 mg/kg; s.c.) obtida da alga marinha vermelha *S. filiformis*.

Além disso, avaliou-se a importância do sítio lectínico da LCc no seu efeito antinociceptivo e anti-inflamatório. Como observado na **Figura 13**, a LCc [35 ± 7s], quando combinada com seu açúcar inibidor mucina, não perdeu a capacidade de reduzir o comportamento nociceptivo induzido por Formalina [190 ± 28s]. Vale salientar que a administração de mucina (100 mg/kg; i.v.) [148 ± 10s], como um controle negativo, não foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo dos ratos.

**Figura 13- Efeito da LCc associado à mucina na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os animais receberam solução salina 0,9% (i.v.), LCc (10 mg/kg; i.v.), LCc (10 mg/kg; i.v.) associado à mucina (100 mg/kg; i.v.) ou mucina (100 mg/kg; i.v.) 30min antes da injeção intrarticular de Formalina a 1,5% (50 µL/art.). Os dados estão expressos como média ± E.P.M. de seis animais por grupo \* p<0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo sham. # p<0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo Formalina e + p<0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo mucina. (ANOVA, Teste de Bonferroni).

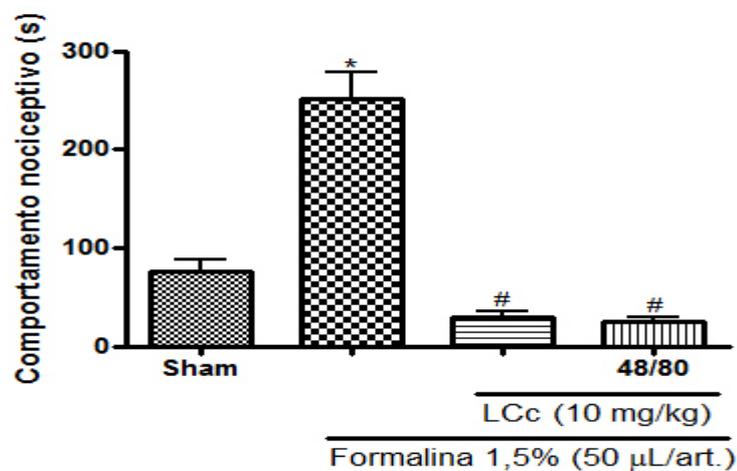
É possível sugerir algumas hipóteses para esses resultados, a primeira seria que o sítio da LCc responsável pelos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório seja diferente do sítio de ligação ao açúcar. Assim, LCc poderia ser classificada como uma quimerolectina, que possui, além do domínio de ligação a carboidratos um outro domínio não relacionado, o qual pode apresentar qualquer outra atividade biológica, atuando independentemente do domínio de ligação ao açúcar (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Podemos também sugerir que a ligação da LCc com seu hapteno mucina *in vivo* tenha sido desfeita devido a interações com outras moléculas do organismo, as membranas biológicas, por exemplo, podem ter açúcares de maior afinidade (RIVANOR, 2014).

Mais recentemente, DE QUEIROZ *et al.* (2015) mostraram que o domínio lectínico de LCc não está envolvido na sua ação anti-inflamatória no edema de pata induzida por carragenana. Entretanto, nesse mesmo estudo, a mucina foi capaz de reverter o efeito de LCc no edema de pata induzido por dextrana e histamina, mas somente nos primeiros 30min de experimento. Com base nesses achados, os autores sugeriram que o efeito da ligação da mucina a LCc está ativa apenas na primeira hora após o tratamento.

#### 4.2.2 Avaliação da Participação de Grânulos Mastocitários no Efeito Anti-inflamatório da LCc

O pré-tratamento com o composto 48/80, que provoca a degranulação dos mastócitos, não conseguiu reverter o efeito de LCc (10 mg/kg, i.v.) [25 ± 5] ( $p < 0,05$ ) sobre a hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina [252 ± 26] (**Figura 14**). Esses resultados sugerem que o efeito anti-inflamatório de LCc é independente da estabilização da membrana de mastócitos.

**Figura 14- Participação de grânulos mastocitários no efeito anti-inflamatório da LCc**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

LCc (10 mg/kg; i.v.) foi administrada 30min antes da injeção intra-articular de Formalina (1,5%/ 50 µL.) após tratamento com composto 48/80 para depleção de mastócitos durante 4 dias (0,6 mg/kg nos 3 primeiros dias e 1,2 mg/kg no quarto dia). O controle negativo recebeu salina 0,9% (s.c.). O controle positivo recebeu Formalina. As barras representam a média ± E.P.M. de seis animais por grupo. \*  $p < 0,05$  indica diferença significativa em relação ao grupo Sham. #  $p < 0,05$  indica diferença significativa em relação ao grupo Formalina. (ANOVA, Teste de Bonferroni).

É sabido que os mastócitos estão envolvidos em processos inflamatórios devido à grande variedade de mediadores liberados, tais como histamina e serotonina (5-HT), que são mediadores pré-formados, armazenados em grânulos celulares, e, são essenciais para o desenvolvimento dos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória (MARONE *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2010). Além disso, a histamina é um mediador que pode ativar células endoteliais, levando à expressão de moléculas de adesão (WALZOG; GAEHTGENS, 2000). Já a 5-HT possui ações semelhantes às da histamina, sendo responsável pela sensação de dor na inflamação, através de sua ação sobre neurônios sensoriais (DRAY, 1995). Ademais, os mastócitos são responsáveis pela liberação de outros mediadores como o fator de

ativação plaquetária, leucotrienos e uma variedade de citocinas (FEITOSA *et al.*, 2002; DATTI *et al.*, 2002).

Relatos na literatura mostraram que animais pré-tratados sistemicamente com o composto 48/80 apresentaram uma redução do número de mastócitos granulosos devido à degranulação aumentada (PEREIRA *et al.*, 2012). Coura *et al.* (2015), avaliando o efeito anti-inflamatório de uma fração polissacarídica sulfatada da alga *Gracilaria cornea*, relataram que a referida fração (9 mg/kg; s.c.) inibiu de maneira significativa o edema de pata induzido por Cg em animais com mastócitos intactos, em todos os intervalos de tempo analisados, mas mostrou-se ineficiente em reduzir o edema quando comparado aos animais com mastócitos degranulados depletados pelo 48/80. Em conclusão, os autores sugeriram que a referida fração estaria estabilizando a membrana dos mastócitos.

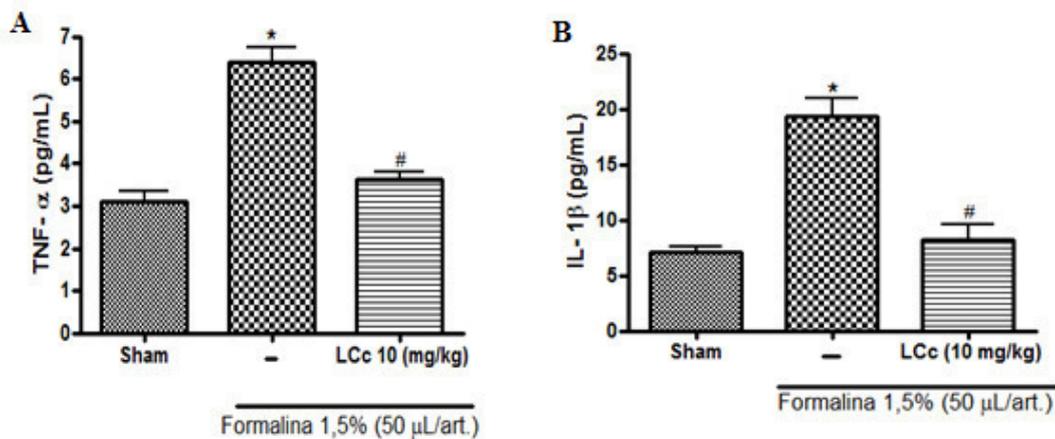
Foi observado que extratos de algas com o *Enteromorpha linza*, *Chlorella vulgaris*, *Fucus vesiculosus* e *Spirulina platensis*, possuem a capacidade de impedir a liberação de histamina a partir dos mastócitos (PRICE; SANNY; SHEVLIN, 2002).

Nossos resultados mostram que LCc manteve seus efeitos mesmo nos animais com mastócitos depletados, sugerindo que LCc não atua estabilizando a membrana de mastócitos, mas, provavelmente, age atenuando o efeito dos mediadores liberados por essas células. Nesse contexto, De Queiroz *et al.* (2015) demonstraram que a referida lectina reduz o edema de pata induzido por histamina através da inibição dos receptores H1. Os autores consideraram a histamina como o principal alvo do efeito anti-inflamatório de LCc, além de caracterizar o seu envolvimento na dor inflamatória.

#### **4.2.3 Avaliação das Dosagens das Citocinas TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$**

A injeção de Formalina na ATM induziu um aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$  ( $6,4 \pm 0,3$  pg/mL) e IL-1 $\beta$  ( $19,4 \pm 1,6$  pg/mL) no tecido periarticular em relação aos grupos Sham ( $3 \pm 0,2$  pg/mL;  $7 \pm 0,4$  pg/mL, respectivamente). O tratamento com LCc (10 mg/kg) reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ) os níveis de TNF- $\alpha$  em 43% ( $3,6 \pm 0,2$  pg/mL) e IL-1 $\beta$  em 49% ( $8,2 \pm 1,4$ ), com relação ao grupo Formalina 1,5% (**Figura 15**).

**Figura 15- Efeito da LCc nos níveis de TNF- $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B) no tecido periarticular**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os animais foram tratados com LCc (10 mg/kg; i.v.) ou Salina estéril 0,9% 30min antes da injeção intrarticular de Formalina a 1,5% (50  $\mu$ L/art.). Após 45min o tecido periarticular de cada animal foi coletado para quantificação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . \*  $p < 0,001$  indica diferença significativa em relação ao grupo sham. #  $p < 0,001$  indica diferença significativa em relação ao grupo Formalina. (ANOVA, Teste de Bonferroni).

O desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória envolve o aumento de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . O TNF- $\alpha$  possui um papel chave na hipernocicepção, pois ativa uma cascata de mediadores secundários envolvidos no recrutamento de células inflamatórias, com a indução da liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, estimulando ainda a produção de mediadores simpatomiméticos (CUNHA *et al.*, 1992; CUNHA *et al.*, 2005). Além disso, o TNF- $\alpha$  tem um potencial patogênico no desenvolvimento da sinovite, na formação do *pannus* reumatoide e no processo de destruição da articulação, uma vez que aumenta a proliferação de sinoviócitos no processo de destruição da articulação (CAMUSSI; LUPIA, 1998). Estudos anteriores demonstraram que a inibição da produção de TNF- $\alpha$  em animais com artrite produz efeito antinociceptivo (FREITAS *et al.*, 2016).

A IL-1 $\beta$ , por sua vez, é um agente hipernociceptivo extremamente potente e atua periféricamente (FERREIRA *et al.*, 1988; CUNHA *et al.*, 2005). É considerada um dos elementos centrais no desenvolvimento da artrite reumatoide, especialmente por promover o aumento na secreção de citocinas e produção de metaloproteinases (MMPs) que são responsáveis pelo processo inflamatório e destruição da cartilagem articular (KOSTRZEWA-JANICKA *et al.*, 2012). Rodrigues (2012) demonstrou em seu estudo, que a IL-1 $\beta$  desempenha papel mais relevante na fase inicial da artrite reumatoide. Essa informação torna-se importante ao indicar uma introdução precoce de tratamentos terapêuticos direcionados às

vias reguladoras de IL-1 $\beta$ . Desta forma, nossos resultados ganham relevância, já que a LCc mostrou efeito inibitório sobre essa citocina para o tecido periarticular na fase inicial da DTM.

Vários autores relataram que as concentrações de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , são elevadas no fluido sinovial de pacientes com DTM, sugerindo que estas citocinas podem estar envolvidas na patogênese destas desordens (KIM *et al.*, 2012; KANEYAMA *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2017). Portanto, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são consideradas citocinas importantes por estarem envolvidas em algumas patologias da ATM (KE *et al.*, 2007), induzindo a produção de metaloproteinases que degradam irreversivelmente componentes da matriz extracelular, incluindo a cartilagem articular, além de atuar na destruição óssea e na proliferação celular (KOSTRZEWA-JANICKA *et al.*, 2012; SUZUKI *et al.*, 2002).

Pesquisas revelam o importante papel de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no processo de migração neutrofílica através do aumento das moléculas de adesão na superfície endotelial, sendo estas citocinas necessárias para o correto endereçamento dos neutrófilos (KELLY; HWANG; KUBES, 2007; SAUNDERS *et al.*, 2005).

Esses dados estão de acordo com os observados anteriormente em ensaios de imunohistoquímica, no qual LCc foi capaz de inibir a imunoexpressão dessas citocinas na membrana sinovial de ratos com artrite induzida por Zy (RIVANOR *et al.*, 2014). Além disso, também em concordância com os nossos resultados, DE Queiroz *et al.* (2015) demonstraram que a referida lectina foi capaz de reduzir a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no edema de pata induzido por carragenana, promovendo uma fraca marcação em fibrócito, neutrófilo e ceratinócito, evidenciando, assim, sua ação anti-inflamatória. Esses dados nos faz inferir que os efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo da LCc podem estar atrelados à inibição da liberação de agentes pró-inflamatórios.

Ademais, o efeito anti-inflamatório dessa lectina foi analisado em um estudo realizado por Abreu *et al.* (2012), no qual LCc induziu em cultura de células esplênicas de camundongo BALBc (*in vitro*) níveis elevados da IL-10, principal citocina reguladora na resposta anti-inflamatória.

Em estudo realizado por Freitas *et al.* (2016) com a lectina obtida de sementes da planta *Abelmoschus esculentus* (AEL), foi verificado que ela apresenta atividade anti-inflamatória e antinociceptiva na hipernocicepção inflamatória induzida por zymosan na ATM de ratos, com mecanismos dependentes da inibição dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e da integridade da via HO-1.

Damasceno *et al.* (2016) relataram o potencial farmacológico da Frutalina (FTL), uma lectina isolada das sementes de *Artocarpus incisa*, na dor orofacial. FTL inibe o comportamento nociceptivo induzido por Formalina na ATM e no lábio superior direito de ratos.

Diferente dos nossos achados, Figueiredo *et al.* (2010) demonstraram que o efeito anti-hipernociceptivo da lectina da alga marinha vermelha *H. cervicornis*, na hipernocicepção inflamatória induzida por carragenana, ovalbumina e prostaglandinas E<sub>2</sub> na pata de ratos, não está relacionado com a supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , estando associado à redução da migração neutrofílica e também ao aumento da produção de NO.

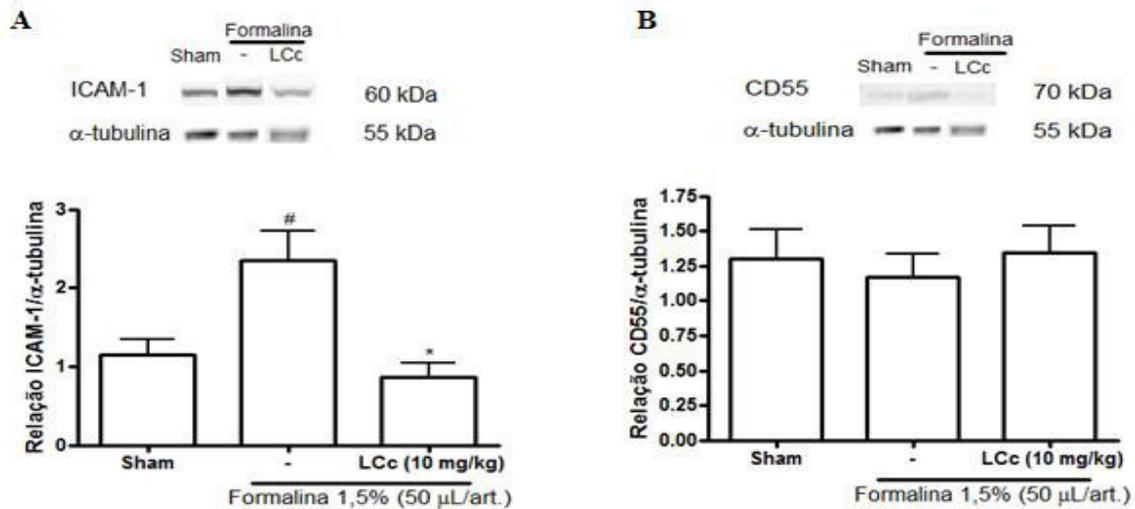
#### **4.2.4 Envolvimento de ICAM-1 e CD55 no Efeito Anti-inflamatório de LCc**

Tendo em vista que LCc reduz o infiltrado celular e neutrofílico no lavado sinovial de ratos com artrite induzida por Zy (RIVANOR *et al.*, 2014) e reduz o extravasamento plasmático e os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mostrados nesse trabalho, decidimos investigar se LCc está interferindo na interação leucócito-endotélio. Para isso realizamos a quantificação da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e do fator de aceleração do decaimento (CD 55).

A análise de Western blotting demonstrou que o pré-tratamento com LCc (10 mg/kg) diminuiu significativamente a produção dos níveis de ICAM-1 em 63% [ $0,9 \pm 0,2$ ] quando comparado ao grupo Formalina [ $2,3 \pm 0,3$ ] no tecido periarticular (**Figura 16A**).

Com relação aos níveis de CD55, LCc não afetou ( $P > 0,05$ ) [ $1,4 \pm 0,2$ ] a produção dessa proteína no tecido periarticular quando comparado aos grupos Formalina [ $1,6 \pm 0,2$ ] e Sham [ $1,4 \pm 0,2$ ] (**Figura 16B**).

**Figura 16- Efeito da LCc nos níveis de ICAM-I (A) e CD55 (B) no tecido periarticular**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os tecidos periarticulares foram coletados e processados para realizar Western Blotting com o objetivo de mensurar os níveis de ICAM-1 e CD55. Observa-se que LCc reduz a expressão proteica de ICAM-1 quando comparado ao grupo Formalina e não altera os níveis de CD55. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  EPM dos níveis de ICAM-1 e CD55 que resultou da relação da densidade dessas proteínas e de  $\alpha$ -tubulina (n = 5). \*p < 0,05 em relação ao grupo Sham; #p < 0,05 em relação ao grupo Formalina. (ANOVA, Bonferroni).

A liberação de mediadores inflamatórios ocorre durante a resposta inflamatória, induzindo adesão de neutrófilos a células endoteliais e transmigração para o espaço extravascular que é mediado pela interação entre  $\beta$ 2 integrinas presentes nos leucócitos com ICAM-1, presente principalmente em células endoteliais (DAL SECCO *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2010). Já o fator de aceleração de decaimento (CD55), embora descrita inicialmente como um inibidor da lise dos tecidos pelo sistema complemento, estudos subsequentes sugeriram que esse fator parece funcionar como glicoproteína de superfície anti-adesiva que regula a taxa de migração de polimorfonucleares (PMN) através da membrana epitelial (QUINTEIRO *et al.*, 2014; LAWRENCE *et al.*, 2003).

Esses resultados sugerem que a LCc inibe o recrutamento de células por um mecanismo direto, com a diminuição da expressão das ICAM-1, inibindo a fase de adesão forte dos leucócitos ao endotélio. Além disso, LCc também pode estar inibindo a migração por um mecanismo indireto, atuando sobre células residentes evitando, assim, o recrutamento de leucócitos provocado pelo estímulo inflamatório. Ademais, a redução da quimiotaxia inflamatória é independente dos níveis de CD55 nos tecidos periarticulares.

A fase inicial de adesão é fraca sendo mediada por selectinas endógenas presentes na membrana de leucócitos e/ou no endotélio, e seus resíduos de açúcares ligantes ou glicoconjugados são importantes para que as fases subsequentes de adesão firme e

transmigração ocorram normalmente (LASKY, 1992). Algumas lectinas vegetais já foram sugeridas como sendo moléculas capazes de bloquear essa ligação e, assim, inibir a migração celular *in vivo* por microscopia intravital (PIRES *et al.*, 2016; ALENCAR *et al.*, 2010).

Com relação às lectinas de algas marinhas, Bitencourt *et al.* (2008) mostraram que a lectina da alga marinha vermelha *H. cervicornis* (HCA), uma ligadora de mucina assim como a LCc, inibe a migração de neutrófilos em modelo de peritonite. Os autores sugeriram que o efeito anti-inflamatório de HCA ocorre através da competição entre as selectinas com a mucina das glicoproteínas celulares, diminuindo a migração de neutrófilos para o foco inflamatório.

As glicoproteínas semelhantes à mucina parecem desempenhar um papel fundamental no processo de interação leucocitário-endotélio, provavelmente pela presença de selectinas de ligação de carboidratos (PANÉS; PERRY; GRANGER, 1999; LEY, 2002).

Recentemente, Val (2017) estudando um composto semissintético derivado da planta *Tephrosia toxicaria* (5-hidroxi-6'',6''-dimetilcromano-[2'',3'':7,8]-flavanona- PHO) demonstrou que o mesmo apresenta efeito anti-inflamatório e antinociceptivo na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina na ATM de ratos reduzindo os níveis de expressão de ICAM-1.

15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), produto final da via da COX-2, foi capaz de inibir a extravasamento plasmático, migração de leucócitos e liberação de citocinas inflamatórias IL-6, IL-12, IL-18 e quimiocinas CINC-1 nos tecidos da ATM com artrite induzida por albumina. Além disso, 15d-PGJ<sub>2</sub> aumentou a expressão da molécula anti-adesiva CD55 e da IL-10 citocina anti-inflamatória. Nesse contexto, os autores sugeriram que 15d-PGJ<sub>2</sub> inibe a infiltração de leucócitos e posteriormente o processo inflamatório, através de uma mudança no equilíbrio das propriedades pró e anti-adesivas, podendo ser usado como um potencial fármaco anti-inflamatório para tratar a inflamação induzida pela artrite ATM (QUINTEIRO *et al.*, 2014).

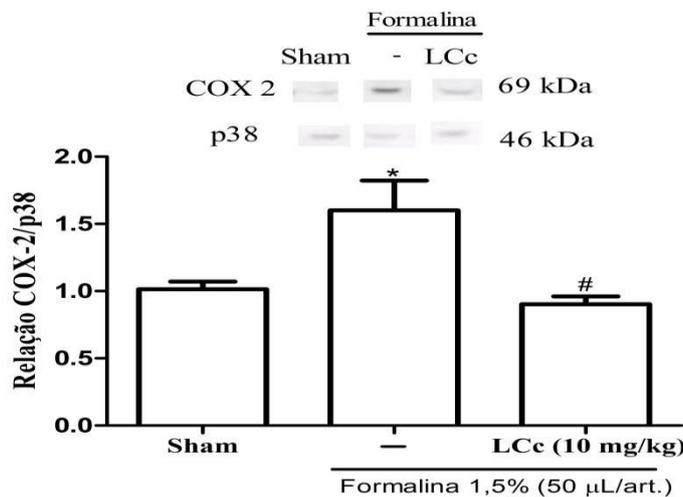
O potencial terapêutico de drogas que atuam como alvo da interação leucócitos-endotélio ou que visam especificamente inibir as citocinas pró-inflamatórias consiste na intervenção farmacológica mais promissora para o controle de perda óssea articular e tem sido muito bem sucedido no tratamento de doenças inflamatórias como artrite (GUNSON *et al.*, 2012). O desenvolvimento de drogas seguras e efetivas que possuam como alvo esses componentes moleculares envolvidos no rolamento e adesão dos leucócitos na resposta inflamatória pode gerar um novo campo, com terapias melhoradas para as desordens associadas à inflamação (PANÉS; PERRY; GRANGER, 1999). Assim, drogas que inibem a

produção de citocinas ou atenuam diretamente a interação leucócito-endotélio são importantes ferramentas anti-inflamatórias e, conseqüentemente, analgésicas.

#### 4.2.5 Participação da COX-2 no Efeito Anti-inflamatório de LCc

A análise de Western blotting demonstrou que o pré-tratamento com LCc (10 mg/kg) diminuiu significativamente a produção dos níveis de COX-2 em 44% [ $0,9 \pm 0,5$ ] quando comparado ao grupo Formalina [ $1,6 \pm 0,2$ ] no tecido periarticular (**Figura 17**).

**Figura 17- Efeito da LCc nos níveis de COX-2 no tecido periarticular**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os tecidos periarticulares foram coletados e processados para realizar Western Blotting com o objetivo de mensurar os níveis de COX-2. Observa-se que LCc reduz os níveis proteicos de COX-2 quando comparado ao grupo Formalina. Os valores foram apresentados como média + EPM dos níveis de COX-2 que resultou da relação da densidade dessa proteína e de p38. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n = 5). \*p < 0,05 em relação ao grupo Sham; #p < 0,05 em relação ao grupo Formalina. (ANOVA, Bonferroni).

Sabe-se que a liberação de IL-1 $\beta$  no tecido periférico estimula a síntese de PGs, especialmente, da PGE<sub>2</sub> induzindo a hiperalgesia inflamatória. A IL-1 $\beta$  também é liberada no gânglio da raiz dorsal, estrutura análoga ao gânglio trigeminal, entretanto a função que essa citocina desempenha nessas estruturas para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória ainda não está bem esclarecida. Estudos sugerem que a sensibilização dos neurônios nociceptivos primários pelas prostaglandinas depende da ativação de receptores neuronais de IL-1 $\beta$  nos terminais periféricos os quais, por sua vez, induzem a liberação de IL-1 $\beta$  no gânglio da raiz dorsal, atuando como neuromodulador da via de liberação de PGs pelas células neuronais (LAZAROV, 2002; ARALDI, 2012).

Além disso, foi demonstrado que a IL-1 $\beta$  ativa os neurônios e as células gliais satélites no gânglio trigeminal levando a uma expressão elevada da enzima COX-2 nestas células e, conseqüentemente, um aumento na produção de PGE<sub>2</sub> que, por sua vez, ativa os neurônios trigeminiais para liberação de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) causando a dor (TAKEDA *et al.*, 2007; NEEB *et al.*, 2011).

A sensibilização dos nociceptores periféricos por PGE<sub>2</sub> ocorre por meio dos receptores prostanoídes E (EP) com subtipos designados EP1, EP2, EP3, e EP4. Entre estes subtipos, EP2 desempenha um papel chave na hiperalgesia inflamatória espinhal (REINOLD *et al.*, 2005). Recentemente, foi mostrado que PGE<sub>2</sub> contribui para a dor inflamatória na ATM por aumentar a expressão do canal de sódio voltagem dependente (Nav1.7) no gânglio trigeminal através do seu receptor EP2 (ZHANG; GAN, 2017). Esses estudos ajudam a melhor compreender a hiperalgesia inflamatória periférica, além de fornecer informações para desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da dor inflamatória na ATM.

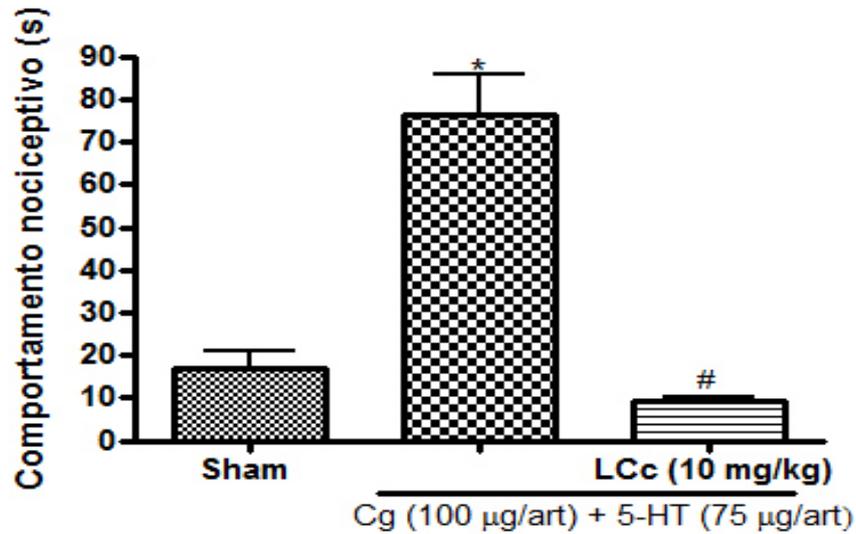
Neste contexto, nossos resultados sugerem que LCc inibe a produção de prostaglandinas, via inibição da expressão da COX-2, reforçando, desta maneira, o efeito anti-inflamatório da LCc na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina. Além disso, esses dados corroboram com o efeito anti-edematogênico de LCc na fase tardia do edema de pata induzido por Carragenana porque, nesta fase, o edema também é sustentado por PGE<sub>2</sub> liberado via COX-2 (DE QUEIROZ *et al.*, 2015).

#### ***4.2.6 Avaliação da Eficácia da LCc na Inflamação Induzida por Carragenana na ATM***

O pré-tratamento (30min) com LCc (10 mg/kg; i.v.) reduziu significativamente em 88% [9  $\pm$  1s] a hipernocicepção inflamatória induzida por Carragenana [76  $\pm$  9s] na ATM de ratos (**Figura 18**).

Carragenana é um agente inflamatório que induz a hipernocicepção na ATM através da migração de neutrófilos (PENA-DOS-SANTOS *et al.*, 2009), síntese de COX e de seus produtos como as prostaglandinas. Além disso, a hipernocicepção química induzida por Carragenana na ATM induz a liberação de aminas simpaticomiméticas, como a norepinefrina, contribuindo para a hiperalgesia inflamatória através da ativação de  $\beta_2$ -adrenoceptores locais (RODRIGUES *et al.*, 2006).

**Figura 18-Eficácia da LCc na inflamação induzida por Carragenana na ATM de ratos**



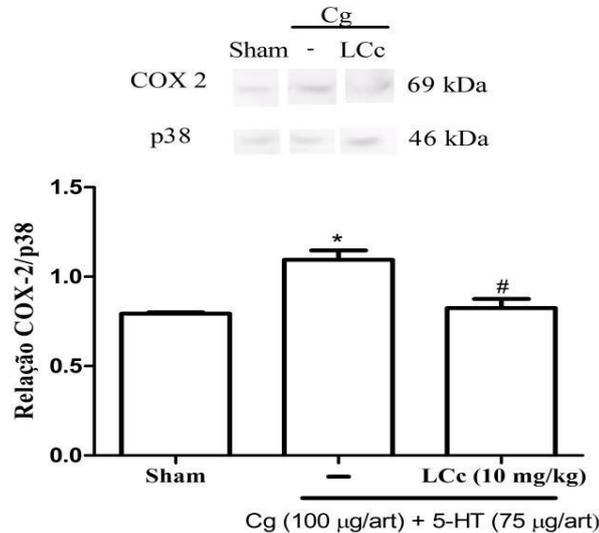
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Carragenana (Cg; 100 µg) ou solução salina foi injetada i.art. na ATM esquerda dos ratos. Para induzir o estímulo nociceptivo, uma dose baixa de 5-HT (75 µg) foi injetada na ATM 1h depois da à injeção de Carragenana. Grupos de animais foram pré-tratados com LCc (10 mg/kg; i.v.) 30min. antes do estímulo. Dados são expressos como média ± E.P.M de 6 animais para cada grupo. \*p <0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo sham e # p <0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo Carragenana. (ANOVA, teste de Bonferroni).

É sabido que a dor inflamatória apresenta um componente simpático que pode ser predominante, sabemos também que a ATM possui uma rica inervação simpática (KIDO *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2006), o que pode justificar o fato de alguns pacientes com DTM não responder ao efeito analgésico dos AINEs, somado a isso, existem pessoas que são intolerantes ao uso prolongado de AINEs e, dessa forma, é de fundamental importância a busca por novos fármacos com efeitos mais amplos representando uma alternativa para o tratamento da dor na ATM.

Adicionalmente, a análise de western blotting demonstrou que o tratamento com LCc (10 mg/kg) diminuiu significativamente [0,8 ± 0,05] os níveis de COX-2 [1,1 ± 0,05] no tecido periarticular (**Figura 19**).

**Figura 19- Efeito da LCc nos níveis de COX-2 na hipernocicepção inflamatória induzida por Carragenana**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os tecidos periarticulares foram coletados e processados para realizar Western Blotting com o objetivo de mensurar os níveis de COX-2. Observa-se que LCc reduz os níveis proteicos de COX-2 quando comparado ao grupo Carragenana. Os valores foram apresentados como média+ EPM dos níveis de COX-2 que resultou da relação da densidade dessa proteína e de p38. Os dados representam a média ± E.P.M. (n = 5). \*p < 0,05 em relação ao grupo Sham; #p < 0,05 em relação ao grupo Carragenana. (ANOVA, Bonferroni).

Como já mencionado, LCc possui efeito anti-edematogênico no edema de pata induzido por Carragenana, reduzindo todas as fases do edema. Além disso, esse efeito pode estar relacionado a eventos inflamatórios que envolvem migração de neutrófilos (VANDERLEI *et al.*, 2010; DE QUEIROZ *et al.*, 2015).

Esses dados reforçam os efeitos da LCc na inibição de COX-2 e consequentemente das PGs. Diversos estudos têm confirmado que a resposta inflamatória é mediada por várias moléculas de sinalização, por vias enzimáticas, pela regulação dos genes das citocinas pró-inflamatórias, tais como IL1-β, TNFα e por COX-2, e a supressão da ativação dos fatores de transcrição, como o NF-kB, podem desempenhar um papel-chave no tratamento de doenças de cunho inflamatório (JEAN *et al.*, 2008; EL-SHITANY *et al.*, 2010).

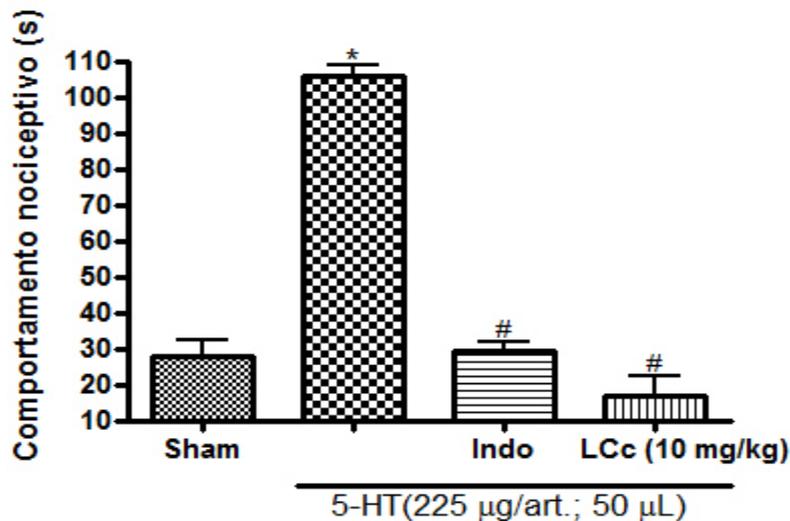
Coura *et al.* (2015) mostraram que uma fração polissacarídica sulfatada da alga vermelha *Gracilaria cornea* apresenta ação anti-inflamatória através da modulação do processo inflamatório agudo por inibição de histamina, permeabilidade vascular e migração de neutrófilos. A sua ação também está relacionada à modulação descendente de IL-1β, TNF-α e COX-2.

#### 4.2.7 Avaliação da Eficácia da LCc na Hipernociceção Inflamatória Induzida por Serotonina (5-HT)

A injeção intra-articular de 5-HT (225 µg) na ATM de ratos aumentou significativamente [106 ± 3s] o comportamento nociceptivo comparado ao grupo salina [28 ± 5s].

O pré-tratamento com LCc (10 mg/kg; i.v.), administrada 30min antes da injeção de 5-HT, promoveu uma redução significativa do comportamento nociceptivo em 84% [17 ± 5s] ( $p < 0.05$ ), quando comparado ao grupo 5-HT. O efeito de LCc foi semelhante ao da Indometacina (5 mg/kg; s.c.), um inibidor da síntese de prostaglandinas, que também reduziu significativamente [72%; 29 ± 2s] a hipernociceção inflamatória induzida por 5-HT (Figura 20).

**Figura 20- Eficácia da LCc na hipernociceção inflamatória induzida por Serotonina na ATM de ratos**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Para a indução da nociceção, os animais foram anestesiados com isoflurano para proceder à injeção intra-articular (i.art.) de 5-HT (225 µg/art.; 50 µL/art.). O grupo controle recebeu salina estéril 0,9% (50 µL; i.art.). Grupos de animais foram pre-tratados com LCc (10 mg/kg; i.v.) 30min antes do estímulo. Um grupo de animais recebeu uma injeção (s.c.) de indometacina (5 mg/kg) como controle positivo. Dados são expressos como média ± E.P.M de 6 animais para cada grupo. \*  $p < 0,05$  indica diferença significativa em relação ao grupo Sham e #  $p < 0,05$  indica diferença significativa em relação ao grupo 5-HT. (ANOVA, teste de Bonferroni).

A serotonina (5-HT) é um importante mediador inflamatório encontrado em níveis elevados em líquido sinovial da ATM de pacientes com dor inflamatória (ALSTERGREN; KOPP, 1999).

Oliveira-Fusaro *et al.* (2012) mostraram em seu estudo que a 5-HT induz nocicepção na ATM de ratos através de mecanismos envolvidos na inflamação, incluindo a liberação de aminas simpáticas locais e prostaglandinas e a ativação local de adrenoreceptores  $\beta 1$  e  $\beta 2$ . Desta forma, sabendo da existência de adrenoreceptores funcionais  $\beta 1$  e  $\beta 2$  na região da ATM, uso de moléculas bloqueadoras desses receptores pode ser um tratamento alternativo para reduzir a dor, especialmente em pacientes que não respondem bem o efeito de drogas anti-inflamatórias não esteroides.

A nocicepção induzida por 5-HT é mediada por a liberação periférica de norepineprina, mas o mecanismo de liberação ainda é desconhecido. No entanto, é bem demonstrado que a ATM é densamente inervada por fibras simpáticas que surgem de células do gânglio cervical superior (RODRIGUES *et al.*, 2006; KIDO *et al.*, 2001) que expressam os receptores de serotonina 5-HT<sub>3</sub> (MORALES; WANG, 2002). Além disso, a ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> expressados nos terminais simpáticos localizados na ATM podem resultar na liberação vesicular de norepinefrina que pode atuar nos adrenoreceptores  $\beta 1$  e  $\beta 2$ -da ATM contribuindo para nocicepção inducida pela 5-HT. A densa inervação simpática da ATM pode explicar por que a 5-HT provoca nocicepção no tecido articular na região da ATM, mas não em tecidos subcutaneos (TAMBELI *et al.*, 2006).

Nesse contexto, nossos resultados ganham relevância, uma vez que a LCc foi capaz de reduzir a hipernocicepção inflamatória induzida por 5-HT na ATM de ratos. Embora não saibamos por quais mecanismos a referida lectina apresenta seu efeito, podemos sugerir que a mesma pode estar atuando no bloqueio dos adrenoreceptores locais e/ou inibindo a liberação de aminas simpáticas (norepinefrina) e PGs. Já mostramos aqui nesse estudo que a LCc reduz a expressão de COX-2 e, conseqüentemente, a de prostaglandinas.

Além disso, esses resultados comprovam a especulação levantada anteriormente nesse estudo na qual mostramos que LCc não perdeu seu efeito quando testada em animais com mastócitos depletados, sugerindo que a mesma não atua estabilizando a membrana de mastócitos, mas, provavelmente, age atenuando o efeito dos mediadores liberados por essas células, nesse caso a serotonina.

Curiosamente, essa mesma lectina foi ineficaz na redução do edema de pata induzido por serotonina, o que nos faz deduzir que, provavelmente, esse agente inflamatório ative outras vias quando aplicado na pata. Já que a característica fisiopatológica do estado hiperalgésico pode diferir dependendo do local da inflamação ou do estímulo hiperalgésico (DE QUEIROZ *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2006). Outra hipótese seria que,

provavelmente, a região intraplantar, diferente da ATM, não seja ricamente inervada por fibras simpáticas.

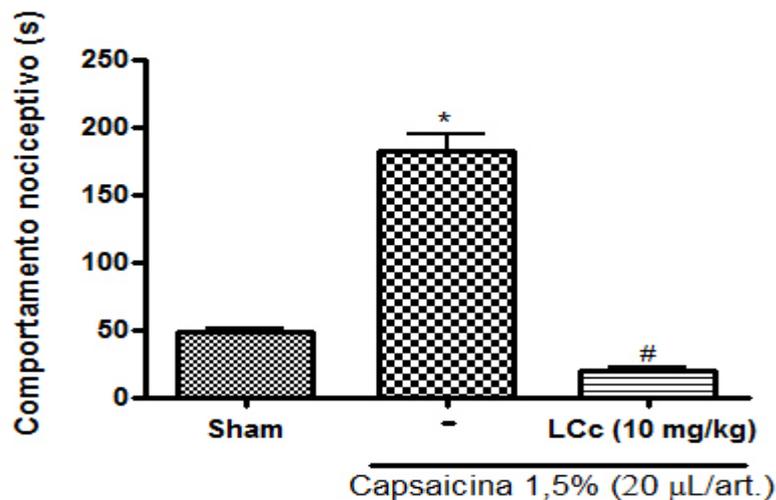
Dados semelhantes aos nossos resultados foram obtidos para composto semissintético derivado da planta *T. toxicaria* (5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona-PHO) no qual reduziu significativamente as respostas nociceptivas induzidas pela Serotonina na ATM de ratos (VAL, 2017).

Em contraste com os nossos resultados, a fração polissacarídica da alga marinha vermelha *G. cornea* (Gc-FI) não foi capaz de inibir a nocicepção induzida por 5-HT na ATM (COURA *et al.*, 2017).

#### 4.2.8 Avaliação da Eficácia da LCc na Nocicepção Induzida por Capsaicina

A injeção intra-articular de Capsaicina (1,5%; 20  $\mu$ L) na ATM de ratos aumentou significativamente [182  $\pm$  13s] o comportamento nociceptivo comparado ao grupo salina [48  $\pm$  3s]. Nos ratos tratados com LCc (10 mg/kg), administrada 30min antes da Capsaicina, houve diminuição ( $p < 0.05$ ) do comportamento nociceptivo em 89,6% (**Figura 21**).

**Figura 21-** Eicácia da LCc no comportamento nociceptivo induzido por Capsaicina na ATM de ratos



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Para a indução da nocicepção, os animais foram anestesiados com isoflurano para proceder à injeção intra-articular (i.art.) de capsaicina (2,5  $\mu$ g; 20  $\mu$ L/art). O grupo controle recebeu salina estéril 0,9% (20  $\mu$ L; i.art.). Grupos de animais foram pré-tratados com LCc (10 mg/kg; i.v.) 30min. antes do estímulo. Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M de 6 animais para cada grupo. \*  $p < 0,05$  indica diferença significativa em relação ao grupo sham e #  $p < 0,05$  indica diferença significativa em relação ao grupo Capsaicina, respectivamente. (ANOVA, teste de Bonferroni).

A capsaicina é uma substância álgica que possui um papel importante no estudo das fibras sensoriais C e A $\delta$ . A nocicepção induzida pela capsaicina ocorre através da ativação do receptor TRPV1, canal catiônico não-seletivo, expresso principalmente, em fibras do tipo C (PIETROVSKI *et al.*, 2006). A ativação de TRPV1 resulta em despolarização dos neurônios aferentes sensoriais que provocam dor (VERONESI; OORTGIESEN, 2006).

Capsaicina, agonista de TRPV1, foi usada para investigar o mecanismo envolvido na antinocicepção induzida por LCc. Considerando que a nocicepção induzida por esse estímulo é de origem neurogênica e que a LCc reduziu o comportamento nociceptivo produzido pela capsaicina, esse dado obtido sugere que a LCc também exerce papel na dor dessa origem. Além disso, podemos sugerir que LCc seja um antagonista dos receptores vaniloides.

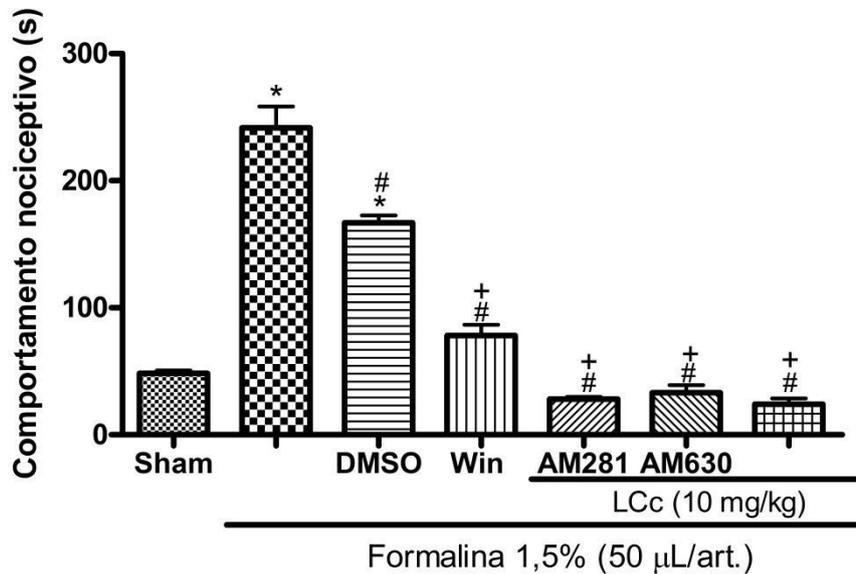
Frutalina (FTL), uma lectina isolada das sementes de *A. incisa*, reduziu a nocicepção orofacial induzida por Capsaicina em todas as doses estudadas, sugerindo que FTL seja um antagonista dos receptores TRPV1 (DAMASCENO *et al.*, 2016).

Melo-Júnior *et al.* (2017) investigaram o envolvimento dos receptores TRPV1 no efeito antinociceptivo do Eucalipto na dor orofacial induzida por Formalina e Capsaicina. Os resultados mostraram que o efeito antinociceptivo do eucalipto foi significativamente inibido pelo pré-tratamento com capsazepina (um antagonista competitivo do canal TRPV1), mas não com vermelho de rutênio (um antagonista TRPV1 não competitivo), sugerindo que o eucalipto interage diretamente com um canal TRPV1.

#### ***4.2.9 Análise da Participação dos Receptores Canabinoides CB1 e CB2 nos Efeitos Anti-inflamatório e Antinociceptivo da LCc***

Para avaliar se os efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo da LCc estão envolvidos na ativação da via dos canabinoides, animais foram pré-tratados com os antagonistas dos receptores CB1-AM281 (3 mg/kg, i.p.) e CB2- AM630 (3 mg/kg, i.p.). A presença de AM281 [ $28 \pm 2s$ ] e AM630 [ $33 \pm 6s$ ] não reverteu os efeitos de LCc (10 mg/kg) [ $24 \pm 5s$ ] na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina 1,5% [ $241 \pm 17s$ ]. O tratamento com WIN 55, 212-2 (1 mg/kg, i.p.) [ $78 \pm 8s$ ], agonista dos receptores canabinoides, reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) as respostas comportamentais nociceptivas induzidas por Formalina (**Figura 22**).

**Figura 22 – Avaliação do envolvimento da via dos canabinoides no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da LCc**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os ratos foram tratados com LCc (10 mg / kg, iv), salina 0,9% (iv), WIN 55, 212-2 (1 mg / kg, ip) ou DMSO-4% 30min antes da injeção intra-articular de Formalina (1,5%; 50 µL/art.). O antagonista de CB1 (AM281; 3 mg / kg) e o antagonista de CB2 (AM630; 3 mg / kg) foram administrados 10min antes do tratamento com LCc. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. de seis animais por grupo \*p <0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo sham, #p <0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo Formalina e +p <0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo DMSO. (ANOVA, Teste de Bonferroni).

O sistema canabinoide é conhecido por desempenhar um papel importante na modulação da dor aguda e crônica (KANO *et al*, 2009; SAGAR *et al*, 2012). No entanto, a descoberta de expressão do receptor nas células do sistema imunológico (FACCI *et al.*, 1995) e células gliais (PERTWEE, 2004) aumentou o interesse da comunidade científica em compreender o efeito dos canabinoides no processo inflamatório.

Esses resultados revelam que as ações antinociceptiva e anti-inflamatória da LCc não são mediados pela ativação dos receptores canabinoides, uma vez que seus efeitos não foram revertidos com administração dos antagonistas AM281 e AM630. Diferente dos nossos achados, o estudo realizado por Gondim *et al.* (2012) mostrou que os receptores canabinoides medeiam o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da eletroacupuntura na ATM de ratos com artrite induzida por Zy.

Burgos *et al.* (2010) avaliaram o papel dos receptores canabinoides na dor orofacial através do teste de Formalina na ATM de ratos. Nesse estudo foi demonstrado que o tratamento com WIN 55,212-2, um agonista canabinoide sintético, reduziu significativamente as respostas comportamentais nociceptivas induzidas por Formalina, além disso, o antagonista

seletivo do receptor CB1 inibiu o efeito do WIN 55,212-2. Portanto, a ativação de receptores CB1 possui efeito importante na regulação da dor sobre a hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina na ATM de ratos.

Ahn *et al.* (2007) investigaram a participação das vias da COX na modulação dos efeitos antinociceptivos dos canabinoides na nocicepção induzida por Formalina (5%) na ATM de ratos e demonstraram que a inibição das vias de COX centrais, presumivelmente através da inibição da COX-2, reduz a dor inflamatória, aumentando o efeito antinociceptivo induzido por canabinoides. Com base nessas observações, os autores sugeriram que a administração combinada de canabinoides com inibidores de COX é uma promessa terapêutica no tratamento da dor inflamatória da ATM. Porém, nossos resultados não corroboram com esses achados, por isso, na tentativa de identificar o mecanismo de ação pelo qual a LCc atua, avaliamos a participação da via do NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> dependente.

#### ***4.2.10 Envolvimento da Via NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> dependente no Efeito Antinociceptivo da LCc***

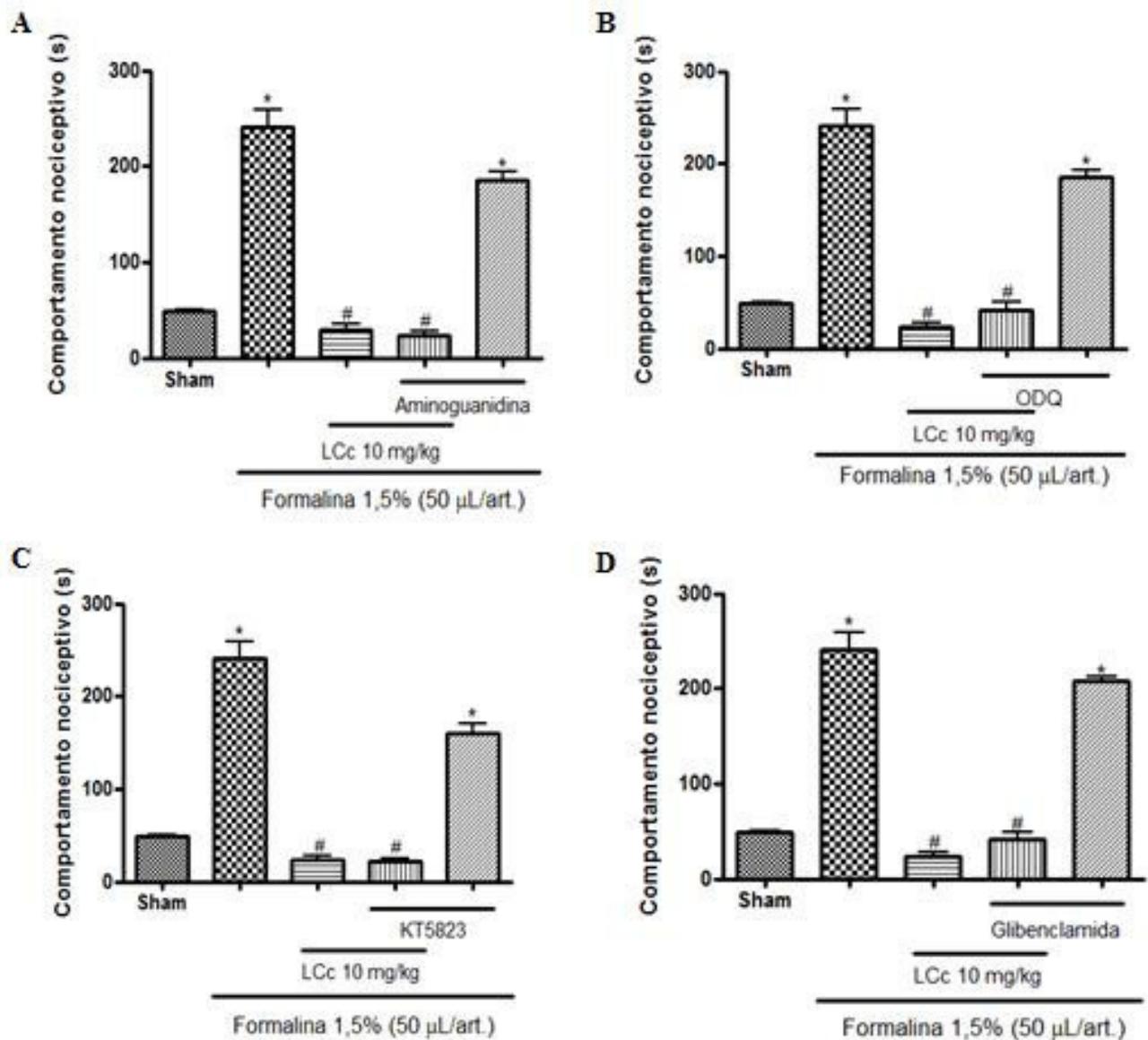
No intuito de avaliar se o efeito antinociceptivo da LCc está envolvido na ativação da via NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> dependente, animais foram pré-tratados com aminoguanidina (30 mg/kg; i.p.) [186 ± 9s], ODQ (5 mg/kg; s.c.) [185 ± 8s], KT5823 (4 µg/mL; s.c.) [160 ± 9s] ou Glibenclamida (10 mg/kg; i.p.) [208 ± 5s] 30min antes do tratamento com LCc (10 mg/kg) [24 ± 5s]. A presença desses inibidores, entretanto, não reverteu significativamente a resposta antinociceptiva da LCc na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina 1,5% [242 ± 17s] (**Figura 23**).

A descoberta de que o NO, produzido pela ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), ativava a enzima guanilato ciclase (Gc) com conseqüente produção de GMPc permitiu demonstrar que o NO induzia antinocicepção periférica via estimulação do GMPc. Desde então vários estudos têm determinado que a via NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> desempenha um importante papel na antinocicepção periférica induzida por acetilcolina (DUARTE *et al.*, 1990), morfina (RODRIGUES; DUARTE, 2000), dipirona (ALVES; DUARTE, 2002), diclofenaco (ALVES *et al.*, 2004), recoxibe (DECIGA-CAMPOS; LOPEZ-MUNOZ, 2004) e xilazina (ROMERO; DUARTE, 2009).

Nossos resultados mostraram que a via NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> dependente não interferiu na resposta antinociceptiva da LCc, uma vez que a inibição da óxido nítrico sintase,

da guanil-sintase, da proteína quinase G ou do bloqueador de canais de potássio dependente de ATP não reverteram o efeito de LCc.

**Figura 23- Participação da via NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> dependente no efeito antinociceptivo da LCc**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os ratos foram tratados com LCc (10 mg/kg, iv) ou salina 0,9% (iv) 30min antes da injeção intra-articular de Formalina (1,5%; 50 µL/art.). (A) aminoguanidina (30 mg/kg; i.p.), (B) ODQ (5 mg/kg; s.c.), (C) KT5823 (4 µg/mL; s.c.), e (D) glibenclamida (10 mg/kg; i.p.) foram administrados 30min antes do tratamento com LCc. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. de seis animais por grupo \* p < 0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo sham, # p < 0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo Formalina. (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Em concordância com os nossos resultados, Silveira (2017) estudando o efeito antinociceptivo do composto semissintético (MC-H) obtido a partir de flores da *moringa oleífera* sobre a hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina na ATM de ratos, mostrou que a via NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> pareceu não regular a capacidade de MC-H na diminuição da sensibilização neuronal periférica, uma vez que a inibição da óxido nítrico sintase, da guanil-sintase e da proteína quinase G não afetou a antinocicepção desse composto.

Júnior *et al.* (2012) demonstraram que o polissacarídeo sulfatado total extraído da alga marinha *Gracilaria caudata* apresentou efeito antinociceptivo sobre a hipernocicepção mecânica induzida por carragenana na pata de camundongos. No trabalho destes autores, esse efeito é mediado pela ativação da via NO/cGMP/PKG seguida da abertura dos canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> e dependente da ação dos opioides endógenos periféricos.

A inibição com aminoguanidina e glibenclamida reverteu o efeito antinociceptivo do composto semissintético-PHO sobre a hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina, relevando que o mecanismo de ação dessa molécula depende da ativação de NO/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> dependente (VAL, 2017).

Os canais K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> dependentes, uma vez bloqueados, são impedidos de liberar o potássio para o meio extracelular causando hiperpolarização celular neuronal, não ocorrendo a despolarização necessária para desencadear a condução do impulso doloroso (HAJHASHEMI; AMIN, 2011). Dependendo da localização, esses canais podem agir direta ou indiretamente nos sinais de transmissão da dor. Atualmente, vários anestésicos utilizados na clínica agem pela interação com os canais de K<sup>+</sup> (McCURDY; SUCULLY, 2005).

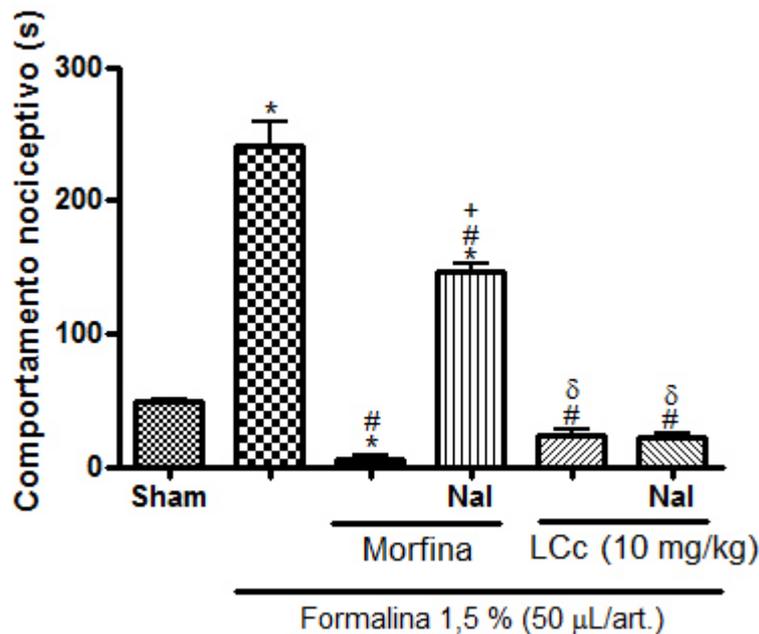
NO tem um papel dual na regulação dos processos de dor e inflamação, ou seja, ele pode mediar nocicepção e inflamação ou induzir um efeito analgésico e anti-inflamatório. Este efeito dual ocorre tanto a nível central como periférico. Muitos estudos têm sido realizados a fim de entender o efeito dual do NO. Além disso, Rocha *et al.* (2002) demonstraram que o NO endógeno é um mediador importante envolvido no desenvolvimento da artrite induzida por Zy, enquanto que a administração farmacológica de NO exógeno pode inibir o curso dos fenômenos nociceptivos (CURY *et al.*, 2011; VIVANCOS *et al.*, 2003).

#### **4.2.11 Avaliação do Envolvimento do Sistema Opióide no Efeito Antinociceptivo da LCc**

Para investigar se o efeito antinociceptivo da LCc (10 mg/kg; i.v.) na resposta nociceptiva induzida por Formalina [242 ± 17s] na ATM ocorre por meio da ativação dos

receptores opioides centrais, os animais foram pré-tratados com naloxona. Os resultados mostraram que a aplicação intratecal de naloxona (15  $\mu$ g) não interferiu (**Figura 24**) no efeito antinociceptivo da LCc (10 mg/kg) [24  $\pm$  5s]. No entanto, como esperado, a naloxona bloqueou [147  $\pm$  5s] a ação antinociceptiva ( $p < 0,05$ ) da morfina (5 mg/kg, s.c.) [7  $\pm$  3s].

**Figura 24- Envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo da LCc**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Formalina (1,5% (50  $\mu$ L/art.) ou salina 0,9% foram injetados i.art. na ATM esquerda de ratos. Naloxona (15  $\mu$ g/10  $\mu$ L) ou salina foram administrados (intratecal) 15min antes da injeção (i.v.) da LCc (10 mg/kg). Animais receberam salina ou LCc (10 mg/kg, i.v.) com ou sem naloxona (10  $\mu$ g/art., 15  $\mu$ L) e morfina (5 mg/kg, s.c.) com ou sem naloxona. Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M de 6 animais para cada grupo \*, #, + e  $\delta$  indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos grupos Sham, Formalina, Morfina e Morfina + Naloxona, respectivamente. (ANOVA, teste de Bonferroni).

Diversos mecanismos parecem contribuir para a analgesia dos opioides durante o processo inflamatório, incluindo ativação da proteína G (ZOLLNER *et al.*, 2003), abertura de canais de  $K^+$ , com conseqüente hiperpolarização da membrana celular e/ou inibição do sistema de adenilciclase, diminuindo a produção AMPc (SCHULTZ; GROSS, 2001), e inibindo canais de  $Ca^{2+}$  voltagem dependentes. A redução de influxo de cálcio nas fibras nervosas acarreta a inibição de liberação de neurotransmissores, contribuindo para a diminuição de transmissão sináptica do impulso nervoso (DICKENSON; SULLIVAN, 1987; LAW *et al.*, 2000). Todos esses eventos atenuam a excitabilidade do neurônio sensorial aferente e diminuem a liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios (BUSCH-DIENSTFERTIG *et al.*, 2010).

Além disso, foi demonstrado que os receptores opioides induzem antinocicepção periférica pela ativação intracelular da via L-arginina/NO/cGMP, e drogas específicas que estimulam diretamente esta via representa um alvo importante para o desenvolvimento de analgésicos periféricos (FERREIRA *et al.*, 1990; VADIVELU *et al.*, 2011).

No presente estudo, foi demonstrado que a resposta antinociceptiva da LCc não foi revertida por naloxona, antagonista não seletivo dos receptores opioides, sugerindo que o efeito antinociceptivo de LCc não ocorre pelo sistema opioide. Esses dados corroboram com resultados obtidos por Rivanor *et al.* (2014), no qual foi mostrado que LCc não atua através dos receptores opioides periféricos na artrite induzida por Zy na ATM de ratos.

De acordo com Vanderlei *et al.* (2010), a resposta antinociceptiva da LCc, em modelos clássicos de nocicepção em camundongos, ocorreu predominantemente através do mecanismo periférico, embora não tenha sido descartado uma possível atuação central. Nesse sentido, podemos sugerir, com base nesses dados, que a LCc atua periféricamente, mas não através dos receptores opioides.

Em concordância com os nossos resultados, Fávaro-Moreira *et al.* (2009) mostraram que o antagonista de receptores opioides naloxona não afeta o efeito antinociceptivo do estradiol, sugerindo que esse efeito é independente do mecanismo opioide periférico, no modelo de dor induzida por Formalina na ATM de ratos.

Ao contrário dos nossos achados, o efeito antinociceptivo de FI-Gc, uma fração polissacarídica da alga *G. cornea*, na resposta nociceptiva induzida pela Formalina na ATM de ratos é medido pelos receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ , por ativação da via de sinalização intracelular NO/GMP<sub>C</sub>/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> dependente e pela integridade da via da HO-1 (COURA *et al.*, 2017).

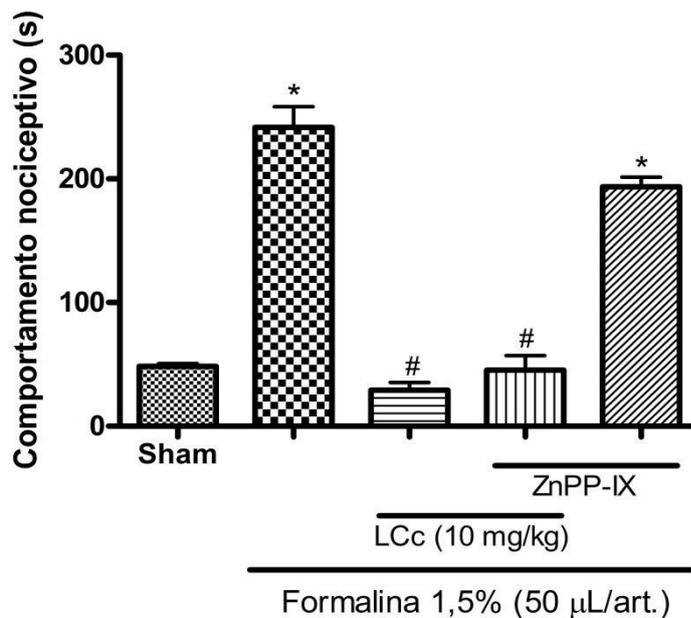
Recentemente, Araújo *et al.* (2017) mostraram que potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da fração polissacarídica F II da alga marinha *S. filiformis* é mediado pela ativação de receptores de opioides no subnúcleo caudal e inibição da liberação de mediadores inflamatórios no tecido periarticular da ATM de ratos.

Macedo *et al.* (2016) mostraram que o efeito protetor da testosterona endógena no desenvolvimento da hipernocicepção na ATM de ratos é mediado por coativação dos receptores opioides  $\mu$  e  $\kappa$ .

#### 4.2.12 Avaliação do Envolvimento da Via da HO-1 nos efeitos Antinociceptivo e Anti-inflamatório da LCc

Para avaliar a participação da via da HO-1 nos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da LCc (10 mg/kg, i.v.), os ratos foram pré-tratados (s.c.) com ZnPP-IX (3 mg/kg), um inibidor específico da HO-1, resultando na inibição desta via [ $193 \pm 8s$ ]. No entanto, ZnPP IX não inibiu os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatória da LCc (10 mg/kg, i.v.) [ $45 \pm 12s$ ] sobre a hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina [ $241 \pm 17s$ ] na ATM de ratos (**Figura 25**).

**Figura 25-** Envolvimento da via HO-1 no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da LCc



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Para a indução da nocicepção, os animais foram anestesiados com isoflurano para proceder à injeção intra-articular (i.art.) e Formalina a 1,5% (50  $\mu$ L/art.). ZnPP IX ou solução salina foram administrados (s.c.) previamente (30min) à LCc (10 mg/kg, i.v.). \* $p < 0,05$  indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo Sham; # $p < 0,05$  indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo Formalina (ANOVA; Bonferroni).

Esses resultados mostram que os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios da LCc não dependem da integridade da via da HO-1, tendo em vista que seus efeitos não foram bloqueados pelo ZnPP-IX. Portanto, LCc não atua ativando HO-1. Esses dados estão de acordo com os obtidos anteriormente por Rivanor *et al.*, (2014), no qual foi mostrado que essa proteína não depende da via da HO-1 para reduzir a artrite induzida por Zy na ATM de ratos.

A hemoxigenase-1 é uma proteína sensível ao estresse produzido por vários agentes oxidantes. A sua expressão, em resposta a diferentes mediadores inflamatórios, pode contribuir para reduzir a inflamação, assim como seus eventos clássicos, além de possuir efeitos protetores contra injúrias oxidativas em vários órgãos (GRANGEIRO *et al.*, 2011; ALCARAZ; FERNÁNDEZ; GUILLÉN, 2003). Diversos estudos demonstraram que a HO-1 e seus metabólitos monóxido de carbono (CO) e biliverdina (BVD) são capazes de modular o processo inflamatório (YACHIE *et al.*, 2003).

Diferente dos nossos achados, alguns estudos têm demonstrado a participação da via da HO-1 na ação antinociceptiva e anti-inflamatória de alguns compostos (GRANGEIRO *et al.*, 2011; VANDERLEI *et al.*, 2011; VICENTE *et al.*, 2003). Nesse sentido, o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da lectina da planta *A. esculentus* (AEL) foi inibido pela administração ZnPP-IX, no modelo de artrite induzida por Zy na ATM de ratos (FREITAS *et al.*, 2016).

O composto semissintético-PHO apresenta atividade anti-inflamatória e antinociceptiva na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina na ATM de ratos, com mecanismo dependente da inibição da integridade da via HO-1 (VAL, 2017).

Abreu *et al.* (2016a) mostraram que a lectina da alga marinha vermelha *S. filiformis* teve sua capacidade anti-inflamatória reduzida quando os animais foram tratados com ZnPP- IX, no edema de pata induzido por carragenana. Em concordância, Vanderlei *et al.* (2011) demonstraram que o pré-tratamento com ZnPP-IX reverteu a atividade anti-inflamatória do polissacarídeo sulfatado da alga *Gracilaria birdiae*.

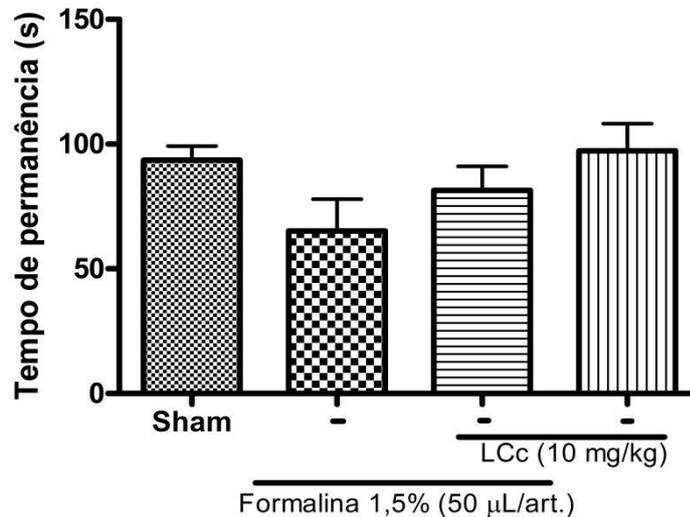
O controle farmacológico da dor inflamatória baseia-se em duas estratégias principais: 1) uso de fármacos que previnem a sensibilização dos nociceptores, ou seja, inibem a liberação ou a ação de substâncias que os sensibilizam, como os inibidores de COX, simpatolíticos e bloqueadores de citocinas; 2) fármacos que revertem à sensibilização dos nociceptores já instalada, como dipirona e principalmente os opioides (VERRI-JUNIOR *et al.*, 2006; CLEMENTE-NAPIMOGA *et al.*, 2009). Com base nos nossos achados, podemos sugerir que LCc atua, mais precisamente, na prevenção da sensibilização dos nociceptores.

#### **4.2.13 Efeito de LCc no Teste do Rota Rod**

LCc (10 mg/kg) não alterou o tempo de permanência dos animais [ $97 \pm 11$ s] em relação ao grupo Sham [ $93 \pm 6$ s]. Observamos uma baixa redução [ $75 \pm 10$ s] no tempo de

permanência dos ratos tratados com Formalina (1,5%), no entanto essa redução não foi significativa, quando compara ao grupo sham ( $p > 0,05$ ) (**Figura 26**).

**Figura 26- Eficácia da LCc no teste do rota rod**



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

LCc (10 mg/Kg; i.v.) ou salina estéril foi aplicada 30min antes da aplicação intra-articular de Formalina (1,5%). O grupo controle recebeu salina. Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M de 8 animais para cada grupo (ANOVA, teste de Bonferroni).

É sabido que a ação depressora de vários fármacos analgésicos sobre o sistema nervoso central e muscular pode reduzir a coordenação motora do animal bem como sua expressão do comportamento nociceptivo (SOUZA *et al.*, 2002; AMORIM *et al.*, 2016). Semelhante a lectinas de plantas (DAMASCENO *et al.*, 2016; PIRESb *et al.*, 2013), os dados obtidos nesse estudo demonstraram que o tratamento com LCc não afetou a coordenação motora dos animais e o relaxamento muscular, confirmando nossos achados nos testes de nocicepção.

Com relação à lectina de algas, Abreu (2016b) mostrou que a lectina da alga marinha vermelha *S. filiformis* (LSf) atua no sistema nervoso central apresentando um efeito antidepressivo-símile sem alterar o padrão de locomoção espontânea dos camundongos no teste do campo aberto.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise por dicroísmo circular da lectina obtida da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (LCc), uma lectina ligante à mucina, mostrou que a referida proteína é composta por 4% de  $\alpha$ -hélice, 38% de folhas- $\beta$  e 58% de regiões desordenadas. Essa análise revelou ainda que, mesmo sendo submetida a altas temperaturas, a conformação secundária de LCc não sofreu mudanças significativas mostrando-se uma proteína termoestável.

A LCc apresenta efeito antinociceptivo sobre a hipernocicepção induzida por Formalina e Capsaicina na ATM de ratos reduzindo o comportamento nociceptivo o que nos faz sugerir que LCc atue na dor neurogênica.

A LCc apresenta efeito anti-inflamatório sobre a hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina na ATM de ratos, reduzindo o extravasamento plasmático, os níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , da molécula de adesão ICAM-1 e da enzima COX-2. Podemos sugerir que LCc está interferindo diretamente na interação leucócito-endotélio, através da diminuição de moléculas de adesão e quimiotaxia inflamatória, e redução da sensibilização direta dos nociceptores, via inibição da produção de COX-2, reduzindo a síntese de prostaglandinas. Além disso, LCc reduz a hipernocicepção inflamatória induzida por Carragenana confirmando o seu efeito anti-inflamatório.

Ademais, LCc apresenta efeito anti-inflamatório sobre a hipernocicepção inflamatória induzida por Serotonina, podendo seu efeito estar relacionado ao bloqueio dos adrenoceptores locais e/ou inibindo a PGs.

Além disso, o efeito da LCc é independente do CD55, dos sistemas canabinoide e opioide e das vias HO-1 e NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>. O efeito da LCc também não afeta a coordenação motora e o relaxamento muscular dos animais.

## 6 CONCLUSÃO

A lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium* C. Agardh, uma proteína composta, predominantemente, por folhas- $\beta$ , apresentou efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório sobre hipernocicepção inflamatória na ATM de ratos, com um mecanismo de ação, relacionado com a redução da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , da molécula de adesão ICAM-1 e da enzima COX-2.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.J.; CONEL, B. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. **Eur J Pharmacol.**, v. 126, p.126–141, 1986.
- ABRAHAM, N.; KAPPAS, G. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase **Pharm. Rev.**, v. 60, p.79–127, 2008.
- ABREU, T. M. *et al.* Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Lectin from Marine Red Alga *Solieria filiformis*. **Pla. Med.**, v. 82, p. 596-605, 2016a.
- ABREU, T. M. **Lectina da alga marinha vermelha *solieria filiformis* (kützing) p.w. gabrielson: caracterização parcial e efeito antidepressivo em modelos experimentais de depressão.** 132 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016b.
- ABREU, T. M. *et al.* Cytokine Production Induced by Marine Algae Lectins in BALB/c Mice Splenocytes. **Prot. & Pep. Lett.**, v. 19, n. 9, p. 975-981, 2012.
- AHN, D. K. Blockade of central cyclooxygenase (COX) pathways enhances the cannabinoid-induced antinociceptive effects on inflammatory temporomandibular joint (TMJ) nociception. **Pain**, v. 132, p. 23–32, 2007.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Bot. Mar.**, v. 34, p. 211–214, 1991.
- AINOUZ, I.L. SAMPAIO. *et al.* Agglutination of enzyme treated erythrocytes by brazilian marine algal extracts. **Bot. Marina.**, v. 35, p. 475-479, 1992.
- AINOUZ, I.L. *et al.* Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*, **Rev. Bras. de Fisi.v.eg.**, v. 7, p. 15-19, 1995.
- ALCARAZ, M.J.; FERNANDEZ, P.; GUILLEN, M.I. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. **Curr. Pharm. Desig.** v. 9, p. 2541–2551, 2003.
- ALENCAR, N.M. *et al.* An antiinflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. **Inflamm Res**, v. 59, n. 4, p. 245-254, 2010.
- ALENCAR, N.M.N. *et al.* Antiinflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **J Pharm Pharmacol**, v. 57, n. 7, p. 919-22, 2005.
- ALEY, K.O. *et al.* Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyyme of protein kinase C. **J.Neurosci. JUN** v. 15; n. 20, p. 4080-5, 2000.

ALSTERGREN, P.; BENAVENTE, C.; KOOP, S. Interleukin 1 $\beta$ , Interleukin 1 receptor antagonist, and Interleukin 1 soluble receptor II in temporomandibular joint synovial fluid from patients with chronic polyarthritides. **J. Oral Max. Surg.** v.61, n.10, p.1171-1178, 2003.

ALSTERGREN, P.; KOOP, S.; THEODORSSON, E. Synovial fluid from the temporomandibular joint: sample quality criteria and levels of interleukin-1 $\beta$  and serotonin. **Acta Odontol. Scand.** v. 57, n.1, p. 16-22, 1999.

ALVAREZ-HERNANDEZ, S. *et al.* Isolation and partial characterization of geraffine, a lectin from the Mexican endemic alga *Codium giraffa* Silva. **Bot. Mar.**, v. 42, p. 573-580, 1999.

ALVES, D. P.; DUARTE, I. D. G. Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron. **Eur J Pharmacol**, v.444, p.47–52, 2002.

ALVES, D. P. *et al.* Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels activation. **Life Sci**, v.74, p.2577–2591, 2004.

AMBROSIO A. L. *et al.* Isolation of two novel mannan- and l-fucose-binding lectins from the green alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 415, p. 245-250, 2003.

AMORIM, R. M. F. *et al.* The leguminous lectin of *Lonchocarpus araripensis* promotes antinociception via mechanisms that include neuronal inhibition of Na<sup>+</sup> currents. **Inflamm. Res.**, v.65, p.701–708, 2016.

ANWAR, A.; ANWAR, I.J.; DELAFONTAINE, P. Elevation of cardiovascular risk by non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Trend. in cardiova. med.**, 2015.

ARALDI, D. **O papel da Interleucina-1 $\beta$  Produzida no Gânglio da Raiz Dorsal no Desenvolvimento da Hiperálgia Inflamatória.** 2012. 96 fls. Tese (doutorado em Biologia Funcional e Molecular, área de Fisiologia). Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, Universidade Estadual de Campinas, 2012.

ARAÚJO, I. W. F. *et al.* Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieria filiformis* in induced temporomandibular joint pain. **International Immunopharmacology**, v. 44, p. 160-167, 2017.

AUGUSTO, V. G. *et al.* Temporomandibular dysfunction, stress and common mental disorder in university students. **Acta Ortop. Bras.**, v. 24(6), p. 330-333, 2016.

AYGÜN, D.; KAPLAN, S.; ODACI, E.; ONGER, M.E.; ALTUNKAYNAK, M.E. Toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review of melatonin and diclofenac sodium association. **Histol. Histopathol.** v. 27, p. 417-436, 2012.

BARRETTO, S.R. *et al.* Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of low-level laser therapy on temporomandibular joint inflammation in rodents. **J. of Photochem. and Photobio. B: Bio.**, v. 129, p. 135–142, 2013.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. **CRC Press**. Taylor & Francis Group, 2006.

BASBAUM, A. I. *et al.* Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**. v. 13, p. 267–284, 2009.

BENEVIDES, N.M.B. *et al.* Purification and Partial Characterization of the Lectin from the Marine Green Alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. **Bot. Mar.**, v. 44, p.17-22, 2001.

BEZERRA, R. F. **Purificação e caracterização parcial da lectina presente no soro do peixe amazônico tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

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

BLUNDEN, G. *et al.* Haemagglutinins in marine algae: Lectins or Phenols? In: “Lectins: Biology, Biochemistry. **Clin. Biochem.**, v. 5, p. 139-145, 1986.

BLUNDEN G, ROGERS DJ, FARNHAM WF. Survey of British seaweeds for hemagglutinins. **Lloydia**. v.38, p.162-168, 1975.

BONANNO, G.; ORLANDO-BONACA, M. Chemical elements in Mediterranean macroalgae. A review. **Ecotox. and Env. Saf.**, v. 148, p. 44–71, 2017.

BOUSNAKI, M.; KOIDIS, P. Platelet-rich plasma for the therapeutic management of temporomandibular joint disorders: a systematic review. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 3799, pages 11, 2017.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of blood group antigens suggested by tests with lectins. In: Plant Lectins. Molecular e Biological aspects. **Ann. Ver. Plant Physiology**, v. 36, p. 209-234, 1954.

BOYD, W. C.; ALMODOVAR, L. R.; BOYD, L. G. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Transfu.**, v. 6, p. 82-83, 1966.

BRITO, F. A. *et al.* Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Braz J of Med. and Biol. Res.**, v. 40, n. 1, p. 105-115, 2007.

BURGOS, E. *et al.* Antinociceptive effect of the cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, in the orofacial and temporomandibular formalin tests. **Eur. J. of Pain.**, v. 14, p. 40-48, 2010.

BURSTON, J. J. *et al.* Cannabinoid CB2 Receptors Regulate Central Sensitization and Pain Responses Associated with Osteoarthritis of the Knee Joint. **PLoS One.**, v. 25, n. 8, 2013.

BUSCH-DIENSTFERTIG, M.; STEIN, C. Opioid receptors and opioid peptideproducing leukocytes in inflammatory pain – Basic and therapeutic aspects. **Brain Behavior Immunity**, v. 24, p. 683–694, 2010.

CAIRNS, B. E. Pathophysiology of TMD pain – basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. **J. of Oral Reha.** v. 37, p. 391–410, 2010.

CALVETE, J.J. *et al.* The amino acid sequence of agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **CMLS Cell. and Mol. Life Sci.**, v. 57, p. 343-350, 2000.

CAMUSSI, G.; LUPIA, E. The future role of anti-tumour necrosis factor (TNF) products in the treatment of rheumatoid arthritis. **Drugs.** v. 55, n. 5, p. 613-20, 1998.

CARDOZO K. H. M. *et al.* Metabolites from algae with economical impact. **Comp. Biochem. Physiol. Part C**, v. 146, p. 60-78, 2007.

CAVADA, B. S. *et al.* Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Prot. and Pept. Sci.**, v. 2, p. 123-135, 2001.

CAVADA, B. S. *et al.* Comportamento da lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. durante a germinação em presença de luz. **Acta Bot. Bras.**, v. 4, p. 13-20, 1990.

CAVALIER-SMITH, T. Only six kingdoms of life. **Proc. R. Soc. Lond.**, v. 271, p. 1251–1262, 2004.

CHAVES, R. P. *et al.* Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells. **Int. J. Biol. Macromol.**, 2017.

CHAVES, H.V. *et al.* Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. **J. Biomed. Biotechnol.** v. 2011, p. 1-11, 2011.

CHAVES, H. V. **Avaliação do papel da via hemeoxigenase-1/ biliverdina/ CO no modelo experimental de dor facial e de artrite induzida por zymosan na articulação temporomandibular de ratos.** 2012. Tese (doutorado em Ciências Médicas). Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Ceará, 2012.

CHICHORRO, J.G.; LORENZETTI, B.B.; ZAMPRONIO, A.R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British J. of Pharm.**, v. 141, p. 1175–1184, 2004.

CHILES, T. C.; BIRD, K. T. *et al.* A comparative study of animal erythrocyte agglutinins from marine algae. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 94, p. 107-111, 1989.

CLAVELOU, P.; DALLEL, R.; ORLIAGUET, T.; WODA, A.; RABOISSON, P. The orofacial formalin test in rats: Effects of different formalin concentrations. **Pain**, v. 62, p. 295-301, 1995.

CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T. *et al.* Gonadal hormones decrease temporomandibular joint kappa mediated antinociception through a down-regulation in the expression of kappa opioid receptors in the trigeminal ganglia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 617, p. 41–47, 2009.

- COELHO, L. C. *et al.* Lectins, Interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. **Evidence-Based Comple. and Alt. Med.**, v. 2017, Article ID 1594074, p. 22 pages, 2017.
- COELHO, M. C.A. *et al.* Adverse effects of glucocorticoids: Coagulopathy. **Eur. Soc. of Endo.**, -15-0198, 2015.
- COURA, C.O. *et al.* Mechanisms involved in the anti-inflammatory action of a polysulfated fraction from Gracilaria cornea in rats. **PLoS One.**, v. 25; p. 10(3), 2015.
- COURA, C.O. *et al.* Mechanisms involved in antinociception induced by a polysulfated fraction from seaweed Gracilaria cornea in the temporomandibular joint of rats. **International J. of Biological Macro.**, 2017.
- COUTAUX, A. *et al.* Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, p. 359-371, 2005.
- CROXFORD, J.L.; YAMAMURA, T. "Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases?" **J Neuroimm.**, v. 166(1-2), p. 3-18, 2005.
- CUNHA, F. Q. *et al.* H.The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 660–664, 1992.
- CUNHA, T. M. *et al.* A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 102, p.1755-1760, 2005.
- CUNHA, T.M. *et al.* Stimulation of peripheral kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO signaling pathway. **Mol. Pain.** v.8, p.8–10, 2012.
- CUNHA, T. M. *et al.* Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.107, p. 4442–4447, 2010.
- CUNHA, T. M. *et al.* Caspase-1 is involved in the genesis of inflammatory hypernociception by contributing to peripheral IL-1b maturation. **Mol. Pain.**v. 6, p.63, 2010.
- CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; FERREIRA, S.H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide.** V. 25, p. 243–254, 2011.
- DAHMS, H. U.; DOBRETSOV, S. Antifouling Compounds from Marine Macroalgae. **Mar. Drug.**, v.15, p. 265, 2017.
- DAL SECCO, D. *et al.* Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. **Nitr. Oxi.**, v. 15, p. 77–86, 2006.
- DAMASCENO, M. B.M.V. *et al.* Frutalin reduces acute and neuropathic nociceptive behaviours in rodent models of orofacial pain. **Chem-Biol. Interac.** v. 256, p. 9-15, 2016.

DATTI, F. *et al.* Influence of chronic unpredictable stress on the allergic responses in rats. **Physiology & Behavior**, v. 77, n. 1, p. 79-83, 2002.

DAVIES, A. J.; KIM, Y. H.; OH, S. B. Painful Neuron-Microglia Interactions in the Trigeminal Sensory System. **The Open Pain J.** v. 3, p. 14-28, 2010.

DE CARVALHO, L. R.; ROQUE, N. F. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química Nova**, v. 23, p. 757-764, 2000.

DECIGA-CAMPOS, M.; LOPEZ-MUNOZ, F. J. Participation of the L-arginine–nitric oxide–cyclic GMP–ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. **Eur J Pharmacol**, v.484, p.193–199, 2004.

DE LEEUW, R.; KLASSER, G. Orofacial Pain: Guidelines for Assessment, Diagnosis, and Management. 5<sup>a</sup> ed. **Quintessence**, 2013.

DE QUEIROZ, I. N. L. *et al.* Dual effects of a lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium* on inflammatory mediators in classical models of inflammation. **Inflamm. Res.**, v. 64, p. 971–982, 2015.

DE ROSSI, S. S. *et al.* Temporomandibular Disorders: Evaluation and Management. **The Med. Clin. of Nort. Amer.**, v. 98, n. 6, p. 1353-1384, 2014.

DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide cyclic GMP pathway. **Eur J Pharmacol**, v.186, p.289–293, 1990.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Brit. J. Anaesth.**, v.75, n.2, p.125-131, 1995.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **J Amer Pharmac**, v. 46, n. 3, p. 208, 1957.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Phar. J.**, v. 18, p. 1-25, 2010.

EL-SHITANY, N. A. *et al.* Thioctic acid protects against carrageenan induced acute inflammation in rats by reduction in oxidative stress, down-regulation of COX-2 mRNA and enhancement of IL-10 mRNA. **Fund. & Clin. Phar.**, v.24, p.91-99, 2010.

EVANS, D. E, RALSTON, S.H. Nitric oxide and bone. **J. Bone Miner Res.** v. 11, p. 300-305, 1996.

FABREGAS, J. *et al.* Agglutinins in marine red algae. **IRCS Med. Sci.**, v.12, p. 298-299, 1984.

FÁVARO-MOREIRA, N. C. *et al.* Peripheral estradiol induces temporomandibular joint antinociception in rats by activating the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway. **Neurosci.** v. 164, p.724–732, 2009.

- FARVIN, K. H. S.; JACOBSEN, C. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. **Food Chem.**, v. 138, p. 1670-1681, 2013.
- FERREIRA, S.H.; LORENSETTI, B.B.; DE CAMPOS, D.I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain**, v. 42, n. 3, p. 365, 1990.
- FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D.; LORENZETTI, B.B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 201, p. 121-129, 1991.
- FERREIRA, S.H. *et al.* Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**. v. 334, p. 698-700, 1998.
- FEITOSA, R. F. *et al.* The pharmacological profile of ovalbumin induced paw o edema in rats. **Mediators Inflammation**, v. 11, n. 3 p. 155–163, 2002.
- FIGUEIREDO, J.G. *et al.* Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: Involvement of nitric oxide, **Pharm., Biochem. and Beh.**, v. 96, p. 371-377, 2010.
- FIORENTINO, P. M., CAIRNS, B. E., HU, J. W. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. **Arch. Oral Biol.**, v.44, p. 27-32, 1999.
- FISCHER, L.; TAMBELI, C. H.; PARADA, C. A. TRPA1-mediated nociception. **Neurosci.**, v. 155, p. 337–338, 2008.
- FONG, A.; SCHUG, S.A.; Pathophysiology of Pain: A Practical Primer. **Plast. and Reconst. Sur.**, v. 134, Number 4S-2, 2014.
- FREDRIKSSON, L.; ALSTERGREN, P.; KOPP, S. Pressure pain thresholds in the craniofacial region of female patients with rheumatoid arthritis. **J. Orofac. Pain.**, v. 17, n. 4, p. 326-332, 2003.
- FREITAS, R. S. *et al.* Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and tnf- $\alpha$  and il-1 $\beta$  suppression. **Inter. Immunophar.**, v. 38, p. 313–323, 2016.
- GABIUS, H. J. *et al.* From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. **Trends Biochem. Sci.**, v. 36, p. 298-313, 2011.
- GAESTEL, M.; KOTLYAROV, A.; KRACHT, M. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. **Nat Rev Drug Discov.**, v.8, n.6, p.480-99, 2009.
- GAUER, R.L; SEMIDEY, M.J. Diagnosis and treatment of temporomandibular disorders. **Am. Fam. Phys.**, v. 91(6), p. 378-86, 2015.

- GE, X. *et al.* Role of Wnt-5A in interleukin-1beta – induced matrix metalloproteinase expression in rabbit temporomandibular joint condylar chondrocytes. **Arth. Rheum.** v. 60, n. 9, p. 2714-2722, 2009.
- GONDIM, A. C. S. *et al.* The potent anti-cancer activity of Dioclea lasiocarpa lectin **J. of Inorg. Bioch.**, v. 175, p. 179–189, 2017.
- GONDIM, D. V. *et al.* CB1 and CB2 contribute to antinociceptive and anti-inflammatory effects of electroacupuncture on experimental arthritis of the rat temporomandibular joint. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 90, p. 1–11, 2012.
- GRANGEIRO, N.M.G. *et al.* Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway may be involved in the antinociceptive activity of etoricoxib, a selective COX-2 inhibitor. **Pharm. Reports.** v. 63, p. 112-119, 2011.
- GREENE, C. S.; KLASSER, G. D.; EPSTEIN, J. B. Revision of the American Association of Dental Research's Science Information Statement about Temporomandibular Disorders. **J Can Dent Assoc.** v.76, p.a115, 2010.
- GREMEAUX, V. *et al.* Evaluation of various ways to deliver information concerning non-steroidal anti-inflammatory drugs to osteoarthritis patients. **Annals of Physical and Reha. Med.** v. 56, p. 14–29, 2013.
- GRIFFITHS, C. *et al.* A new and simple method for delivering camped nitric oxide concentrations in the physiological range: application to activation of guanylyl cyclase-coupled nitric oxide receptors. **Mol. Pharmacol.**, v. 64, p. 1349-1356, 2003.
- GUALTIERI, P. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. **CRC Press.** Taylor & Francis Group, 2006.
- GUIRY, M. D. How many species of algae are there? **J. Phycol.**, v. 48, p. 1057–1063, 2012.
- GUNSON, MICHAEL J. *et al.* Pathophysiology and Pharmacologic Control of Osseous Mandibular Condylar Resorption. **J. Oral Maxillofac Surg.** v. 70, p. 1918-1934, 2012.
- GUPTA, R. *et al.* Orofacial Pain: A Review. **Dent.**, v. 6, p. 3, 2016
- HAIJHASHEMI, V.; AMIN, B. Effect of glibenclamide on antinociceptive effects of antidepressants of different classes. **Clinics**, v. 66, n. 2, p. 321-325, 2011.
- HAMMA, A.; SAGEN, J. Activation of spinal and supraspinal cannabinoid-1 receptors leads to antinociception in a rat model of neuropathic spinal cord injury pain. **Brain Res.**, v. 1412, p. 44-54, 2011.
- HAMSHOU, M. High entomotoxicity and mechanism of the fungal GalNAc/Gal-specific *Rhizoctonia solani* lectin in pest insects. **J. of Insec. Phys.**, v. 59, p. 295-305, 2013.
- HARGREAVES, K.M. Review - Orofacial pain. **Pain.** v.152, p.S25-S32, 2011.

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

HAYASHI, K. *et al.* Active Targeting to Osteosarcoma Cells and Apoptotic Cell Death Induction by the Novel *Lectin Eucheuma serra* agglutinin isolated from a marine red alga. **J. of Drug Delivery.**, v. 2012, Article ID 842785, 11 pages, 2012.

HÆAGGMAN-HENRIKSON, B. *et al.* Pharmacological treatment of oro-facial pain – health technology assessment including a systematic review with network meta-analysis. Review **J. of Or. Reh.**, v. 44, p. 800–826, 2017.

HERSH, E.V.; BALASUBRAMANIAM, R.; PINTO, A. Pharmacologic Management of Temporomandibular Disorders. **Oral. Max. Surg. Clin. N. Am.** v. 20, p.197–210, 2008.

HOHMANN, A. G. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. **Chem Phys Lipids.**, v. 121, p. 173-190, 2002.

HOLANDA, M. L. *et al.* Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, p. 1769-1773, 2005.

HORI, K. *et al.* Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from the red alga *Solieria robusta*. **Phytochem.**, v. 27, p. 2063–2067, 1988.

HORI, K.; MATSUBARA, K.; MIYAZAWA, K. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1474(2), p. 226–236, 2000.

HOWLETT, A. C. The cannabinoid receptors. **Prosta. Other Lipid. Mediat.** v. 68, p. 619-631, 2002.

JEAN, Y. H. *et al.* Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory and analgesic effects of the natural marine compound lemnalol from Formosan soft coral *Lemnalia cervicorni*. **Eur J Pharmacol.** v.578, p.323–331, 2008.

JOLY, A. B. **Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas**, 1965, 406 fls. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1965.

JUAN, L. L. *et al.* Pharmaceutical applications of lectins. **J. of Drug Deli. Sci. and Tech.**, v. 42, p. 126-133, 2017.

JÚNIOR, F.C.V. *et al.* Involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP pathway and endogenous opioids in the antinociceptive effect of a sulphated-polysaccharide fraction extracted from the red algae, *Gracilaria caudate*. **Biom. & Prev. Nut.** v. 2, p.303–309, 2012.

KAM, P. C. A; SO, A. COX-3: Uncertainties and controversies. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v.20, p.50–53, 2009.

KAMIYA, H.; OGATA, K.; HORI, K. Isolation and characterization of a new lectin in the red alga *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze. **Bot Mar.**, v. 15, p. 537-540, 1982.

- KANEYAMA, K. *et al.* Importance of proinflammatory cytokines in synovial fluid from 121 joints with temporomandibular disorders. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 40, p.418-23, 2002
- KANO, M. *et al.* Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. **Physiol Rev.**, v. 89, p. 309-380, 2009.
- KE, J. *et al.* Role NF- $\kappa$ B in TNF- $\alpha$ - induced COX-2 Expression in Synovial Fibroblasts from Human TMJ. **J. Dent. res.** v.86, p. 363-367, 2007.
- KELLY, S. M.; JESS, T.J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism **Bioch. e Biophys. Acta.** v. 1751, p. 119 – 139, 2005.
- KELLY, M.; HWANG, J.M.; KUBBES,P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 120, p. 3-10, 2007.
- KERINS, C. A. *et al.* A role for cyclooxygenase II inhibitors in modulating temporomandibular joint inflammation from a meal pattern analysis perspective. **J. Oral Maxillofac. Surg.** V.62, n.8, p.989-995, 2004.
- KEVILJ, R.; MEHULIC, K.; DUNDJER, A. Temporomandibular disorders and bruxism. **Part. I Min. Stomatol**, v. 56, p. 393-7, 2007.
- KIDO, M. A. *et al.* Topography and distribution of sympathetic nerve fibers in the rat temporomandibular joint: immunocytochemistry and ultrastructure. **Anat. Embryol. (Berl)**. v. 203, p. 357-366, 2001.
- KIM, G. H.; LEE, I. K.; FRITZ, L. Cell–cell recognition during fertilization in a red alga, *Antithamnion sparsum* (Ceramiaceae, Rhodophyta). **Plant Cell Physiol.**, v. 37, p. 621-628, 1996.
- KIM, Y. K. *et al.* Analysis of the cytokine profiles of the synovial fluid in a normal temporomandibular joint: Preliminary study. **J. of C-Max-Fac Sur.** V. 40, p. 337-341, 2012.
- KIM, T. W. *et al.* Pharmacokinetic profiles of the novel COX-2 selective inhibitor cimicoxib in dogs. **The Vet. J.** 2013.
- KOBAYASHI, K. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. **J. Comp. Neurol.**, v. 493, p. 596–606, 2005.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat. Rev. Immunol**, v.13, p.159-75, 2013.
- KOSTRZEWA-JANICKA, J.; JURKOWSKI, P.; NĘDZI-GÓRA, M.; MIERZWIŃSKA-NASTALSKA, E. Inflammatory markers in temporomandibular joint disorders. **Centr Eur J Immunol.**, v.37 (3), p. 290-293, 2012.
- KRISTENSEN, K. D. *et al.* Cytokines in healthy temporomandibular joint synovial fluid. **J. of Oral Reh.**, v.41, p. 250-256, 2014.

KUMAR, V. *et al.* Patologia – bases patológicas das doenças. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.43-78, 1480 p 2010.

KURODA, S. *et al.* Review - Biomechanical and biochemical characteristics of the mandibular condylar cartilage. **Osteo. and Cart.**, v.17, p.1408-1415, 2009.

LAMANAA, S. M. S. *et al.* The anti-inflammatory effect of tramadol in the temporomandibular joint of rats. **Eur. J. of Phar.**, v. 807, p.82–90, 2017.

LASKY, L. A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. **Science**, v. 258, n. 5084, p. 964-969,1992.

LAWRENCE, D. W. *et al.* Antiadhesive role of apical decay-accelerating factor (CD55) in human neutrophil transmigration across mucosal epithelia. **J. Exp. Med.**, v. 198, n. 7, p. 999-1010, 2003.

LAZAROV, N.E. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. **Prog. Neurobiol.**, v. 66(1), p. 19-59, 2002.

LEES, P. *et al.* Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.27, p.479-490, 2004.

LEONE, A. *et al.* COX-2 expression in the inflamed gingival tissues: Immunohistochemistry, citochemistry and biochemistry tests. **Research Journal of Biological Sciences**, v.2, p.449-453, 2007.

LEY, K. *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat. Rev. Immunol.**, v.7, n.9, p.678-689, 2007.

LEE, Y.; LEE, C. H.; OH, U. Painful channels in sensory neurons. **Mol Cells**. v. 20, p. 315-324, 2005.

LEE JK, CHO YS, SONG SI. Relationship of synovial tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 to temporomandibular disorder. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.68, p.1064-1068, 2010.

LIAO, W. R. *et al.* Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, p. 433-439, 2003.

LI, D. *et al.* Assembly of the protoplasm of *Codium fragile* (Bryopsidales, Chlorophyta) into new protoplasts. **J. Integr. Plant Biol.**, v. 50, p. 752–760, p. 2008.

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

LIU, W. *et al.* IL-1 $\beta$  impedes the chondrogenic differentiation of synovial fluid mesenchymal stem cells in the human temporomandibular joint. **INT. J. OF MOL. MED.**, v. 39, p. 317 - 326, 2017.

- LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473–477, 2008.
- LOUIS-JEUNE; ANDRADE-NAVARRO; PEREZ-IRATXETA. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. **Proteins: Structure, Function and Bioinform.**, v. 80, n. 2, p. 374-381, 2012.
- LUCCARINI, P. *et al.* The orofacial formalin test in the mouse: A behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. **Pain**, v.7, p.908–914, 2006.
- LUND, J.P.; LAVIGNE, G.J.; SESSLE, B. J. Dor Orofacial: Da ciência básica à conduta clínica. São Paulo: **Quintessence**, 2002.
- MACEDO, C. G. *et al.* Coactivation of  $\mu$ - and  $\kappa$ -Opioid Receptors May Mediate the Protective Effect of Testosterone on the Development of Temporomandibular Joint Nociception in Male Rats. **J Oral Facial Pain Headache**, v.30(1), p.61-67, 2016.
- MADENOGLU, H. *et al.* Effects of Naloxone and Flumazenil on Antinociceptive Action of Acetaminophen in Rats. **Current Therap. Res.**, v.71, n. 2, p. 111-118, 2010.
- MAGALHÃES, B. G. *et al.* Temporomandibular disorder: otologic implications and its relationship to sleep bruxism. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, 2017.
- MARONE, G. *et al.* Pharmacological modulation of human mast cells and basophils. **Clin Exp. Allergy.**, v.32, n.12, p.1682-1689, 2002.
- MATTHEWS, B.; SESSLE, B.J. Mecanismos periféricos da dor orofacial. In: Dor orofacial – Da ciência Básica à Conduta Clínica. 1ª ed. **Quintessence**. p. 37-46, 2002.
- MCCURDY C.R; SCULLY S.S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sci**. v. 22; n. 78(5), p. 476-484, 2005.
- MCDONOUGH, P. Neuropathic orofacial pain: Cannabinoids as a therapeutic avenue. **T. Int J. of Bioch. & Cell Biol.**, v. 55, p.72–78, 2014.
- MCINNES, I. B. *et al.* Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. **J. Exp. Med.**, v. 184, n.4, p. 1519-1524, 1996.
- MCINNES, I.B.; SCHETT, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **N. engl. J. Med.** v. 365, n.23,p. 2205-2219, 2011.
- MCNAMARA, C. R. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 13525–13530, 2007.
- MELO, F. R. *et al.* Purification and partial characterisation of a lectin from the red marine alga *Vidalia obtusiloba* C. Agardh. **Revista Brasil. Bot.**, v. 27, p. 263-269, 2004.
- MELO-JÚNIOR, J. M.A. *et al.* Acute and neuropathic orofacial antinociceptive effect of eucalyptol. **Inflammopharmacol.** v. 25, p. 247–254, 2017.

MESQUITA, JACILANE XIMENES. **Caracterização estrutural e atividade hipoglicemiante da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* C. Lamourox.** 2010. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2010.

MIGUEL, T. B. A. R. *et al.* Morphology, ultrastructure and immunocytochemistry of *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis*-(Hypneaceae, Rhodophyta) from the coastal waters of Ceará, Brazil. **J. Microsc. Ultrastruct.**, v. 2, p. 104-116, 2014.

MORALES, M.; WANG, S. D. Differential composition of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors synthesized in the rat CNS and peripheral nervous system. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 6732–6741, 2002.

MOTA, M. R. L. *et al.* Modulation of acute inflammation by a chitinbinding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **N-S Arch Pharmacol**, v. 374, p. 1-10, 2006.

MU, J. *et al.* A Novel High-Mannose Specific Lectin from the Green Alga *Halimeda renschii* Exhibits a Potent Anti-Influenza Virus Activity through High-Affinity Binding to the Viral Hemagglutinin. **Mar. Drug.**, v.15, p. 255, 2017.

NAGANO, C. S. *et al.* HCA and HML isolated from *hypnea Cervicornis* and *Hypnea Musciformis* define a novel lectin family. **Protein Sci.**, v.14, p. 2167–2176, 2005a.

NAGANO, C. S. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of HML, a lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Acta Cryst.**, v.61, p. 997–999, 2005b.

NAGANO, C. S. *et al.* Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Prot. and Pep. Lett.**, v. 9(2), p.159–165, 2002.

NAGARKATTI, P. *et al.* Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. **Fut. Med Chem.**, v. 1(7), p. 1333-1349, 2009.

NASCIMENTO, A. S. F. *et al.* Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects. **J. Mol. Recognit.**, v. 25, p. 657–664, 2012.

NASCIMENTO-NETO, L. G. *et al.* Characterization of Isoforms of the Lectin Isolated from the Red Algae *Bryothamnion seaforthii* and its Pro-Healing Effect. **Mar. Drug.**, v. 10, n. 9, p. 1936-1954, 2012.

NEEB, L. *et al.* IL-1b Stimulates COX-2 Dependent PGE<sub>2</sub> Synthesis and CGRP Release in Rat Trigeminal Ganglia Cells. **PLoS ONE**. v. 6(3): e17360. doi:10.1371, 2011.

NEHIRA, T. *et al.* A sensitive method based on fluorescence-detected circular dichroism for protein local structure analysis. **Analy Bioch.**, v. 430, p. 179-184, 2012.

NEUBERT, J. K. *et al.* Use of a novel thermal operant behavioral assay for characterization of orofacial pain sensitivity. **Pain**. v. 116, p. 386-395, 2005.

NEVES, S.A. *et al.* Neutrophil migration induced *in vivo* e *in vitro* by marine algal lectins. **Inflam. Res.**, v. 50, p. 486-490, 2001.

NIU, J. *et al.* Characterization of a new lectin involved in the protoplast regeneration of *Bryopsis hypnoides*. **Chin. J. Oce. Limn.**, v. 27, p. 502-514, 2009.

OLIVEIRA, M.C. *et al.* Evidence for the involvement of endogenous ATP and P2X receptors in TMJ pain. **Eur. J. Pain.**, v. 9, p. 87-93, 2005.

OLIVEIRA-FUSARO, M.C.G. *et al.* 5-HT induces temporomandibular joint nociception in rats through the local release of inflammatory mediators and activation of local  $\beta$  adrenoceptors. **Pharm., Bioch. and Beh.** v.102, p. 458–464, 2012.

OLIVEIRA, S. C.B. *et al.* Modulation of the pharmacological effects of enzymatically-active PLA2 by BTL-2, an isolectin isolated from the *Bryothamnion triquetrum* red alga. **BMC Bioche**, v. 9, p. 16, 2008.

OLIVEIRA, S. R. M. *et al.* Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmel.) Santel. & Hommers. **Rev. Brasil. Bot.**, v. 25, p. 397-403, 2002.

OKESON, J. P. Tratamento das Desordens Temporomandibulares e Oclusão, **Else.**, Rio de Janeiro, 2008.

OKESON, J. P. Dores Bucofaciais de Bell. 5. ed. São Paulo: **Quintess.**, 2003.

OKESON, J. P. Dor orofacial: guia para avaliação, diagnóstico e tratamento. São Paulo (SP): **San. Liv.**, 1998.

OKUBO, M., CASTRO, A., GUO, W., ZOU, S., REN, K., WEI, F., KELLER, A., DUBNER, R. Transition to Persistent Orofacial Pain after Nerve Injury Involves Supraspinal Serotonin Mechanisms. **The J. of Neurosci.** v. 33(12), p. 5152–5161, 2013.

OMOKAWA, Y. *et al.* In vitro and in vivo anti-tumor effects of novel Span 80 vesicles containing immobilized *Eucheuma serra* agglutinin. **Int. J. Pharm.** v. 15, p. 157-167, 2010.

O'NEIL, C. K.; HANLON, J T. Marcum, Z. A. Adverse Effects of Analgesics Commonly Used by Older Adults With Osteoarthritis: Focus on Non-Opioid and Opioid Analgesics. **The Ame. J. of Ger. Phar.** v. 10, n. 6, 2012.

PADI, S. S. V.; NAIDU, P. S.; KULKARNI, S. K. Involvement of peripheral prostaglandins in formalin-induced nociceptive behaviours in the orofacial area of rats. **Inflammopharm.**, v., 14, p. 57–61, 2006.

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

PENA-DOS-SANTOS, D.R. *et al.* Activation of peripheral  $\kappa/\delta$  opioid receptors mediates 15-deoxy-  $\Delta$ 12, 14-prostaglandin J2 induced antinociception in rat temporomandibular joint. **Neurosci.**, v.163, p.1211-1219, 2009.

- PEREIRA, L. P. *et al.* Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **J. of Ethnophar.**, v.139, p.642–648, 2012.
- PÉREZ, M. J.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Review. Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. **Mar. Drug.**, v. 4, p. 52, 2016.
- PERTWEE, R.G. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). **Pharmacol. Rev.**, v. 62, p. 588-631, 2010.
- PERTWEE, R.G. Novel pharmacological targets for cannabinoids. **Curr Neurophar.**, v. 2, p. 9-29, 2004.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. N. Lectin as plant defense proteins. **Plant Phys.**, v. 109, p. 347-352, 1995.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Bio. and Gen. Eng. Reviews.**, v. 15, p. 199-228, 1998.
- PICOLO, G., GIORGI, R., CURY, Y.  $\delta$ - Opioid receptor nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Eur. J. Pha.** v. 391, p.55 - 62, 2000.
- PIETROVSKI, E.F. *et al.* Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene obtained from flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacol.**, v. 83, p. 90-99, 2006.
- PINTO, V. P. T. *et al.* Lectins from the red marine algal species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as tools to differentiate human colon carcinoma cells. **Adv. Pharmacol. Sci.**, v. 2009, p. 1-6, 2009.
- PIRES, A. F. *et al.* A novel N-acetyl-glucosamine lectin of *Lonchocarpus araripensis* attenuates acute cellular inflammation in mice. **Inflamm. Res.**, v. 65, p. 43–52, 2016a.
- PIRES, A. F. *et al.* Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. **Fund. Clin. Pharmacol.**, v. 27, p. 201–9, 2013b.
- PRICE, J.A.; SANNY, C.; SHEVLIN, D. Inhibition of Mast Cells by Algae, **J. of Med. Food**, v. 5, p. 205-210, 2002.
- QUARTILHO, A. *et al.* Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. **Anesthes.**, v. 99, p. 955-960, 2003.
- QUEIROZ, I. N. L. **Caracterização estrutural preliminar e efeitos na inflamação da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides***. 2013. 115 fls. Dissertação (mestrado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica E Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, 2013.
- QUINTEIRO, M. S. *et al.* 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 reduces albumin-induced arthritis in temporomandibular joint of rats. **Eur. J. of Pharm.** v.740, p. 58–65, 2014.

- RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neurosci Biobehav Rev** 28:219-226, 2004.
- RACICH, M.J. Orofacial pain and occlusion: Is there a link? An overview of current concepts and the clinical implications. **J. Prosthet Dent.** v.93, n.2, p. 189-196, 2005.
- RAFFIN, R.P. *et al.* nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indomentacina: Estudo de formulação de Tolerância Gastrintestinal em Ratos. **Acta. Farm. Bon.** v. 2, p. 163-172, 2003.
- RAJAN, R.; SUN, Y. M. Reevaluating Antidepressant Selection in Patients With Bruxism and Temporomandibular Joint Disorder. Review Article. **J. of Psych. Pract.**, v. 23, p.173–179, 2017.
- RANDO, C.; WALDRON, T. TMJ osteoarthritis: A new approach to diagnosis. **Amer. J. of Physical Anthr.**, v. 148(1), p. 45-53, 2012.
- RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- A Review. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 74, p. 101-120, 2009.
- RAVEN, J.A.; GIORDANO, M. Algae. **Curr. Biol.**, v. 24, R590, 2014.
- REINOLD, H. *et al.* Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. **T. J. of Cli. Inv.** v. 115, p. 673–679, 2005.
- REN, K.; DUBNER, R. The role of trigeminal interpolaris-caudalis transition zone in persistent orofacial pain. **Int. Rev. Neurobiol.** v.97, p.207-25, 2011.
- RHODUS, N.L. *et al.* Proinflammatory cytokine levels in saliva before and after treatment of (erosive) oral lichen planus with dexamethasone. **Oral. Dis.**, v. 12, n. 2, p. 112-116, 2006.
- RICHARDSON, D. *et al.* Characterisation of the cannabinoid receptor system in synovial tissue and fluid in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Arth. Res. and Ther.**, v. 10, n.2, p. 43, 2008.
- RIVANOR, R. L. C. *et al.* A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. **Intern. Immunophar.**, v. 21, p. 34-43, 2014.
- ROCHA, F. A. C.; ANDRADE, L. E. C.; JANCAR, S. Immune complex induced arthritis in rats: role of lipid mediators on cell infiltration. **Med. Inflamm.**, v. 5, p. 104-109, 1996.
- ROCHA, F. A. C. PAF modulates eicosanoids and TNF release in immune-complex arthritis in rats. **J. Lipid Media. Cells Sig.**, v.16, p. 1-10, 1997
- ROCHA, J. C.S. *et al.* Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **British J. of Phar.** v. 136, p.588 -596, 2002.
- RODRIGUES, A. R. C. **Role of il-1B in rheumatoid arthritis.** 2012. 91 fls.Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas). Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, 2012.

- RODRIGUES, L.L. *et al.* Peripheral sympathetic component of the temporomandibular joint inflammatory pain in rats. **J. Pain.**, v. 7, p.929–936, 2006.
- RODRIGUES, A.R.; DUARTE, I.D. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. **Br J Pharmacol**, v.129, p.110–114, 2000.
- ROGERS, D.J.; HORI, K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobio.**, v. 260-261, p. 589-593, 1993.
- ROGERS, D. J.; BLUNDEN, B.; EVANS, P. R. *Ptilota plumosa*, a new source of a blood group B specific lectin. **Med. Lab. Sci.**,v. 34, p. 193-200, 1977.
- ROMERO, T.R.L.; DUARTE, I.D.G.  $\alpha$ 2-Adrenoceptor agonist xylazine induces peripheral antinociceptive effect by activation of the *L*-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat. **Eur J Pharmacol**, v.613, p.64–67, 2009.
- ROVERONI, R. C. *et al.* Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. **Pain**, v. 94, p. 185-191, 2001.
- ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, v. 45, p. 211-216, 1991
- SAGAR, D. R. *et al.* Dynamic changes to the endocannabinoid system in models of chronic pain. **Philos. Trans. R. Soc. B.**, v. 367, p. 3300-3311, 2012.
- SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 765-769, 1998.
- SATO, Y. *et al.* The role of endogenous glucocorticoids in lymphocyte development in melanocortin receptor 2-deficient mice. **Bio. and Bioph. Res. Comm.**, v. 403, p. 253–257, 2010.
- SATOH, K. *et al.* Expression of cyclooxygenase-I and -2 in IL-1 $\beta$ -induced synovitis of the temporomandibular joint. **J Oral Pathol Med.**, v.38, p. 584–590, 2009.
- SATO, Y. *et al.* Entry inhibition of influenza viruses with high mannose binding lectin ESA-2 from the red alga *Eucheuma serra* through the recognition of viral hemagglutinin. **Mar. Drugs**, v. 13, p. 3454-3465, 2015.
- SATO, Y. *et al.* High mannose-specific lectin (KAA-a) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 405, p. 291-296, 2011.
- SAUNDERS, B.M. *et al.* Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long- term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. **J. Immunol.** v. 174, p. 4852-4859, 2005.
- SCHOLZ, M. *et al.* Ortho-Carbaborane derivatives of indomethacin as cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitors. **Bioorg. & Med. Chem.** v.20, p.4830–4837, 2012.

SCHULTZ, J.; GROSS, G. Opioids and cardioprotection. **Pharmac. Ther.**, v. 89, p. 123-137, 2001.

SEIFI, M. *et al.* Comparative effectiveness of Low Level Laser therapy and Transcutaneous Electric Nerve Stimulation on Temporomandibular Joint Disorders. **J. Las. Med. Sci.**, v.8, p. 27-31, 2017.

SHAEFER, J.R. *et al.* Pain and Temporomandibular Disorders: A Pharmaco-Gender Dilemma. **Dent Clin. N. Am.**, v. 57, p. 233–262, 2013.

SHEN, H.; KREISEL, D.; GOLDSTEIN, D. R. Processes of Sterile Inflammation. **J Immunol**, v.191, p.2857-2863.

SHIBUTA, K. *et al.* Organization of hyperactive microglial cells in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord associated with orofacial neuropathic pain. **Brain Res.** v. 1451, p.74–86, 2012.

SHINAL, R.M, FILLINGIM, R.B. Overview of Orofacial Pain: Epidemiology and Gender Differences in Orofacial Pain. **Dent Clin. N. Am.** v. 51, p. 1–18, 2007.

SILVA, N. S. F.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. Effects of different spinal morphine doses in rats. **Rev. Bras. Anesthesiol.** v.54, n.1, p.60-67, 2004.

SILVA, L.M.C.M. *et al.* Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocladia capillacea*. **Bio. and Pha. Bull.**, v. 33, p. 830-835, 2010.

SILVEIRA, F. D. **Receptores Opioides e Enzima Hemeoxigenase-1 Medeiam Antinocicepção de um Derivado Semissintético (Mc-H) Obtido a Partir de Flores da *Moringa Oleifera* em Modelo Experimental de Dor Na ATM de Ratos.** 75 f. Dissertação Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*.

SINGH, R.S.; THAKUR S.R.; BANSAL, P. Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.1, p.12, 2013.

SIQUEIRA, J. T. T.; TEIXEIRA, M.J. Dores orofaciais - diagnóstico e tratamento. São Paulo: **Art. Méd.**, 2012.

SOARES, M.P.; BACH, F.H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential, **Trends in Mol. Med.** v. 15, p. 50-58, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CEFALÉIA (SBC). Dores Orofaciais e Disfunção Têmporo-Mandibular, 2010. Disponível em: <http://www.sbce.med.br>. Acesso em: 14 de Nov. 2017.

SOSTRES, C. *et al.* Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Prac. & Res. Clin. Gastroent.** v. 24 p.121–132, 2010.

SOUZA, A. L. *et al.* In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. **Br. J. Pharmacol.**, v.135, p. 239–47, 2002.

SPECIALI, J.G.; DACH, F.; Temporomandibular Dysfunction and Headache Disorder. **Head.**, v.55, p.72-83, 2015.

STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z.A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechn. Adv.**, v. 29, p. 483-501, 2011.

SU, N. *et al.* Association of malocclusion, self-reported bruxism and chewing-side preference with oral health-related quality of life in patients with temporomandibular joint osteoarthritis. **Internat. Dent. J.**, 2017.

SUZUKI, T. *et al.* Co-expression of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  in synovial tissues and synovial fluid of temporomandibular joint with internal derangement: comparison with histological grading of synovial inflammation. **J. Oral Pathol Med.** v. 31, p. 549-57, 2002.

TAKEDA, M. *et al.* Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation. **Pain.** v. 129, p. 155–166, 2007.

TAKEDA, M. *et al.* Enhanced excitability of rat trigeminal root ganglion neurons via decrease in A-type potassium currents following temporomandibular joint inflammation. **Neurosci.** v. 138, n. 2, p. 621-630, 2006.

TAKEUCHI, Y. *et al.* Effects of experimentally induced inflammation on temporomandibular joint nociceptors in rats. **Neurosci. Lett.** v. 354, n. 2, p. 172-174, 2004.

TAMBELI, C. H. *et al.* A novel mechanism involved in 5-hydroxytryptamine-induced nociception: the indirect activation of primary afferents. **Neurosci.**, v.141, p.1517–1524, 2006.

TEIXEIRA, E. H. *et al.* Biological Applications of Plants and ALgae Lectins: An Overview, **Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology**, Prof. Chuan-Fa Chang (Ed.), ISBN: 978-953-51-0864-1, InTech, 2012.

TING, E. Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. **Life Sci.**, v. 81, p. 765–771, 2007.

TJOLSEN, A. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. **Pain.**, v. 51(1), p. 5-17, 1992.

TOGASHI, R. H. **Atividade biológica das lectinas de sementes de *Erythrina fusca* e *velutina*, de algas marinhas *Hypnea musciformis*, *Bryothsmnion seaforthii* e *triquetrum* e do produto natural diterpeno casbano, em culturas de *Pseudomonas aeruginosa*.** 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Sobral, Ce, Brasil.

TORRES-CHÁVEZ, K.E. *et al.* Effect of gonadal steroid hormones on formalin-induced temporomandibular joint inflammation. **Eur J Pain**, v. 16, p. 204–216, 2011.

- TORRES, F. A. E. *et al.* New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 24, p. 265-276, 2014.
- VALE, M. L. *et al.* Anti-nociceptive effect of thalidomide on zymosan-induced experimental articular incapacitation. **Eur. J. Pharm.**, v. 536, n. 3, p. 309-317, 2006.
- VANDERLEI, E.S.O. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **Int. Immunophar.**, v. 10, p. 1113-1118, 2010.
- VANDERLEI, E.S.O. *et al.* The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflam. Res.** v. 60, p. 1121-1130, 2011.
- VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W. E.; GOLDSTEIN, J. I. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevein brasiliensis*) latex. **Plant.**, v. 183, p. 258-262, 1991.
- VAL, D. R. **Avaliação da Segurança e da Atividade Antinociceptiva de um Composto Semissintético Derivado de Tephrosia Toxicaria Pers. em Ratos.** 137 f. Tese em Biotecnologia (Renorbio). Universidade Federal de Pernambuco.
- VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 411-52, 1992.
- VENKATESHA, S. H.; BERMAN, B. M.; MOUDGIL, K. D. Review- Herbal medicinal products target defined biochemical and molecular mediators of inflammatory autoimmune arthritis. **Bioorg. & Med. Chem.** v. 19, p. 21-29, 2011.
- VEMURI, V.K.; MAKRIYANNIS, A. Medicinal Chemistry of Cannabinoids. **Clin. Pharm. & Ther.** 2015.
- VERRI-JUNIOR, W.A. *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharm. & Ther.** v. 112, p. 116-138, 2006.
- VERONESI, B., OORTGIESEN, M. The TRPV1 receptor: target of toxicants and therapeutics. **Toxicol. Sci.**, v. 89, p. 1-3, 2006.
- VIANA, G.S.B. *et al.* Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz and *B. triquetrum* (S.G. Gmel) M. Howe. **Braz. J. of Med. and Bio. Res.** v. 37, p. 713-722, 2002.
- VICENTE, A. M. *et al.* Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. **J. of Pharm. and Exp. Therap.** v. 307, p. 1030-1037, 2003.
- VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Current opinion in structural biology. **Lectins.** v. 9, p. 707-714, 1999.
- WANG, S. *et al.* Molecular characterization of a new lectin from the marine alga *Ulva pertusa*. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 36, p. 111-117, 2004.

WAITE, P. M., ASHWELL, K. W. Trigeminal Sensory System. In: PAXINOS, G.; MAI, J. K. **The Hum. Ner. Sys.** USA: Elsevier, p. 1093-1124, 2004.

WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: the path to a new understanding of acute inflammation. **News Physiol. Sci.**, v.15, n. 3, p.107-113, 2000.

WENINGER, W.; BIRO, M.; JAIN, R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. **Nature Reviews Immunology**, v.14, p. 232–246, 2014.

ZAMAN, F. *et al.* Dexamethasone differentially regulates Bcl-2 family proteins in human proliferative chondrocytes: Role of pro-apoptotic Bid. **Tox. Lett.**, v. 224, p.196– 200, 2014.

ZHANG, P.; GAN, YE-H. Prostaglandin E2 Upregulated Trigeminal Ganglionic Sodium Channel 1.7 Involving Temporomandibular Joint Inflammatory. Pain in Rats. **Inflammation**, v. 40, 2017.

ZIÓŁKOWSKA, N. E.; WLODAWER, A. Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. **Acta Biochim. Pol.** v. 53, p. 617–26, 2006.

ZOLLNER, C. *et al.* Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. **Mol. Phar.** v. 64, n. 2, p. 202-210, 2003.

ZOTELLI, V. L. R. *et al.* Acupuncture Effect on Pain, Mouth Opening Limitation and on the Energy Meridians in Patients with Temporomandibular Dysfunction: A Randomized Controlled Trial. **J. Acupunct. Meridian. Stud.**, v. 10, n. 5, p. 351 e 359, 2017.

YACHIE, A. *et al.* Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**. v. 228, p.550-556, 2003.

YAMASAKI, Y. *et al.* Modulation of paratrigeminal nociceptive neurons following temporomandibular joint inflammations in rats. **Exp. Neurol.**, v. 214, p. 209-218, 2008.

**ANEXO**



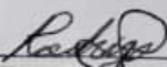
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "LECTINA DA ALGA *CAULERPA CUPRESSOIDES*: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PARCIAL E SEU POTENCIAL SOBRE A HIPERNOCICEPÇÃO INFLMATÓRIA NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS.", protocolo nº69/2015, sob responsabilidade do Prof. Dr. Norma Maria Barros Benevides, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 26 de março de 2016.

Vigência do projeto	01/02/2014 a 31/12/2017
Espécie/Linhagem	Coelhos Albinos 1-3 anos Rato heterogênico Wistar 6 semanas
Nº de Animais	248
Peso/Idade	240 g
Sexo	Machos/fêmea
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 26 de março de 2016

  
Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
Coordenador do CEUA - UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Sipe: 1528734