

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**



**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE PREPARAÇÃO DA LECTINA
DE SEMENTES DE *Cratylia mollis* EM CAMUNDONGOS**

FABIANA BEZERRA DE MELO

ORIENTADORA:

Profa. Dra. LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO COELHO

CO-ORIENTADORA:

Profa. Dra. MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA

RECIFE/2009

FABIANA BEZERRA DE MELO

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE PREPARAÇÃO DA LECTINA
DE SEMENTES DE *Cratylia mollis* EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE/2009

Melo, Fabiana Bezerra de

Atividade antiinflamatória de preparação da lectina de sementes de *Cratylia mollis* em camundongos / Fabiana Bezerra de Melo. – Recife: O Autor, 2009.

48 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica e Fisiologia, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Proteínas 2. Lectina 3. *Cramool* – Atividade antiinflamatória 4. *Cratylia mollis* 5. Camundongos I. Título.

**577.112
572.6**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

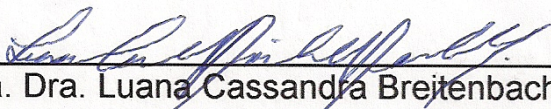
**UFPE
CCB – 2009-113**

FABIANA BEZERRA DE MELO

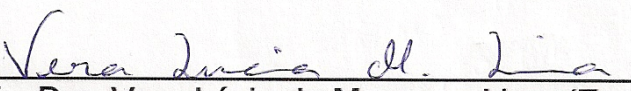
**“Atividade antiinflamatória de preparação da lectina de sementes de
Cratylia mollis em camundongos”**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

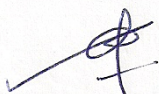
Aprovado por:



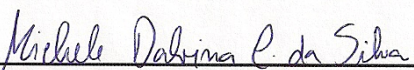
Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (Presidente)



Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima (Examinador interno)



Profa. Dra. Rita de Cássia Moura do Nascimento (examinador externo)



Dra. Michele Dalvina Correia da Silva (examinador externo)

ÍNDICE ANALÍTICO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE FIGURAS	II
RESUMO	III
<i>ABSTRACT</i>	IV
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Lectinas	01
1.2. Cramoll	04
1.3. Purificação da Cramoll	05
1.4. Inflamação	06
1.4.1. Fenômenos irritativos	07
1.4.2. Fenômenos vasculares	08
1.4.3. Fenômenos exsudativos	08
1.5. Antiinflamatórios	08
1.5.1. Antiinflamatórios esteróides	08
1.5.2. Antiinflamatórios não-esteróides (AINEs)	09
1.5.3. Inibidores seletivos da cicloxigenase-2 (COXIBs)	10
1.6. Justificativa	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
4. ARTIGO	30
5. CONCLUSÃO	48

Dedico este trabalho aos meus pais, Tomaz e Elisabete, por todo esforço para nos proporcionar o crescimento profissional.

Dedico ao meu marido, Dilson, pela força, pelas palavras de incentivo e todo auxílio que me prestou.

Dedico em especial a minha filha, Maria Júlia, por lhe amar profundamente, por quem desejo ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

As professoras Luana Cassandra e Maria Tereza, pela paciência, compreensão, pela valiosa atenção e pela forma carinhosa com que me orientaram.

A professora Vera Menezes que me acolheu com carinho e me norteou nos primeiros momentos do curso.

Aos caros professores que ministraram o curso, pela dedicação, pelos conhecimentos e experiências que nos disponibilizaram.

Aos meus colegas de laboratório, sempre muito generosos, por não hesitarem em prestar-me auxílio ou esclarecimento.

A Maria pela imensa disponibilidade em participar de nossos experimentos e partilhar seus conhecimentos.

A Djalma e Myron, pela disposição constante em ajudar.

Aos funcionários, João e Severina, pela gentileza e amizade.

A Deus, por me proporcionar mais esta dádiva.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Protocol to obtain Cramoll 1,4.....	46
Figura 2. Anti-inflammatory activity of preparations of the seed lectin of <i>Cratylia mollis</i> in male mice: 1- negative control (0.15 M NaCl); 2- positive control (acetyl salicylic acid, 7.5 mg/animal); 3- Cramoll 1,4 (200 µg/animal); 4- Cramoll 1,4 (500 µg/animal); 5- Cramoll 1,4 (1000 µg/animal); 6- Con A (200 µg/animal).....	47
Figura 3. Anti-inflammatory activity of preparations of the lectin of <i>Cratylia mollis</i> in females mice: 1- negative control (0.15 M NaCl); 2- positive control (acetylsalicylic acid, 7.5 mg/animal); 3- Cramoll 1,4 (200 µg/animal); 4- Cramoll 1,4 (500 µg/animal); 5- Cramoll 1,4 (1000 µg/animal).....	48

RESUMO

Cramoll é uma lectina purificada das sementes de *Cratylia mollis*. Possui diferentes formas moleculares, isolectinas ou isoformas (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4), com especificidades distintas para monossacarídeos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiinflamatória de Cramoll 1,4 (preparação contendo Cramoll 1 e Cramoll 4) em camundongos. Cramoll 1,4 foi obtida a partir de fracionamento salino do extrato das sementes, seguido de cromatografia de afinidade em Sephadex G-75. O teste de atividade antiinflamatória de escolha foi o método da medida do edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os animais foram tratados com Cramoll 1,4 (200, 500 e 1000 µg/animal), concanavalina A, Con A, (200 µg /animal) utilizada como lectina controle, ácido acetilsalicílico (7,5 mg/animal), controle positivo, ou NaCl 0,15 M, controle negativo. Após 4 h, os animais foram sacrificados e as patas pesadas. Os resultados mostraram que a Cramoll foi dose dependente e a redução da medida do edema da pata foi mais efetiva em ratos machos (83,6 e 94,2 %, 500 e 1000 µg/animal, respectivamente) em relação às fêmeas (46,4% e 73,9%, 500 e 1000 µg/animal, respectivamente). Nos animais machos a redução plantar pelo uso de Cramoll 1,4 e Con A (200 µg/animal) foi de 76,2 e 75,1 %, respectivamente. Os ensaios mostraram que todas as preparações com lectinas foram mais efetivas que o AAS com exceção da concentração de 200 µg/animal, para as fêmeas, em que houve uma redução de apenas 18,8 %.

Palavras-Chave: lectina; *Cratylia mollis*; Cramoll; atividade antiinflamatória.

ABSTRACT

Cramoll is a purified lectin of the seeds of *Cratylia mollis*. It possesses different molecular forms, iso-lectin or iso-forms (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 and Cramoll 4), with different specifications for each monosaccharide. The objective of this work was to evaluate the anti-inflammatory activity of Cramoll 1,4 (preparation containing Cramoll 1 and Cramoll 4) in mice. Cramoll 1,4 was obtained initially from the fractionation of the extract of the seeds in a saline solution, followed by affinity chromatography in Sephadex G-75. The test of choice to study the anti-inflammatory activity was the method of measuring the paw edema induced by carrageenan in laboratory mice. The animals were treated with Cramoll 1,4 (200, 500 and 1000 ($\mu\text{g}/\text{animal}$), concanavalin A (Con A) (200 $\mu\text{g}/\text{animal}$) utilized as a lecithin control, acetyl salicylic acid (7.5 mg/animal), positive control, or NaCl 0.15 M, negative control. After 4 hours, the animals were euthanized and the paws weighed. The results showed that Cramoll was dependent upon the dosage administered and the reduction of the extent of the edema of the paw was found to be more effective in male mice (83.6 and 94.2%, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{animal}$, respectively) in relation to the females (46.4% and 73.9%, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{animal}$, respectively). In the male animals, when the dosage of Cramoll 1,4 and Con A 200 $\mu\text{g}/\text{animal}$) was utilized the reduction was 76.2 and 75.1%, respectively. The analysis showed that all the preparations with lectin were more effective than ASA with the exception of the concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{animal}$, in the females, there was a reduction of only 18.8%.

Word-key: lectin; *Cratylia mollis*; Cramoll; anti-inflammatory activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não-imunológica, que apresentam dois ou mais sítios de ligação capazes de interagir, de forma reversível, com carboidratos ou glicoconjugados (Goldstein *et al.*, 1980; Sharon & Lis, 2004) como açúcares livres, resíduos de carboidratos de polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos, que podem estar livres ou conjugados à membrana da célula (Monzo *et al.*, 2007). A interação lectina-carboidrato nos sítios de ligação dá-se através de pontes de hidrogênio, coordenações metálicas, interações de Van Der Waals e interações hidrofóbicas (Schwartz *et al.*, 1993; Drickamer & Taylor, 1998).

A referência a sua origem não imune ocorre para distingui-las de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Enquanto os anticorpos são estruturalmente semelhantes, as lectinas diferem entre si quanto à composição aminoacídica, requerimento de metais, peso molecular e estrutura tridimensional. Além disto, as lectinas são encontradas não só em animais, mas em outros organismos isentos de sistema imune como plantas e bactérias (Moreira *et al.*, 1991).

As lectinas são encontradas em uma ampla variedade de espécies como vegetais superiores, algas, fungos, animais vertebrados e invertebrados, bactérias e vírus (Lóris, 2002; Sharon & Lis, 2004; Alencar *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2009). No reino das plantas as lectinas estão presentes em maior quantidade em grãos de leguminosas e gramíneas (Mancini Filho *et al.*, 1979; Pusztai, 1991), mas são também abundantes em tecidos vegetais como raiz, folha, talo, vagem, frutas, sementes, flores e casca (Coelho & Da Silva, 2000; Wu *et al.*, 2001; Coutiño-Rodríguez *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2008). As lectinas provenientes de leguminosas são as mais

estudadas e caracterizadas (Sharon, 1993; Cavada *et al.*, 1998; Paiva *et al.*, 2006; Favacho *et al.*, 2007). Em sementes de leguminosas, as lectinas podem constituir cerca de 10% das proteínas solúveis (Sharon & Lis, 1990). As lectinas diferem entre si por sua estrutura molecular, especificidade a carboidratos e atividades biológicas (Sharon & Lis, 2004).

Os sítios de ligação para as unidades glicídicas permitem às lectinas aglutinar vários tipos de células (Kristensen, 2001), inclusive as hemácias, sem alterar a sua estrutura (Kennedy *et al.*, 1995; Correia *et al.*, 2008). Sua interação com a célula pode ser inibida, em muitos casos, por carboidratos (Diaz *et al.*, 1999). Têm sido utilizadas para o estudo da especificidade e da interação entre proteína-proteína (Buts *et al.*, 2001) e proteína-carboidratos (Sharon, 1993; Sharon & Lis, 1995).

A especificidade para estas moléculas varia amplamente entre as diferentes lectinas (Sharma & Surolia, 1997), condicionado pela variabilidade estrutural dos sítios de união (Sharon, 1993), onde as interações hidrofóbicas, as modificações pós-traducionais e a oligomerização têm um papel essencial (Vijayan & Chandra, 1999). Segundo Loris *et al.* (1998) as lectinas de leguminosas formam um grande grupo de proteínas homólogas que apresentam estruturas terciárias praticamente idênticas. Contudo pequenas diferenças em sua seqüência de aminoácidos resultam em estruturas quaternárias distintas, conferindo-lhes especificidades sacarídicas bem peculiares (Brinda *et al.*, 2005).

Além da variabilidade estrutural dos sítios de união, outro fator influencia para a elevada afinidade das lectinas por oligossacarídeos e monossacarídeos particulares que é a existência de distintos subsítios próximos ao sitio de união aos carboidratos, subsítios que têm um pequeno número de resíduos (Loris *et al.*, 1998).

As fitohemaglutininas (i.e. lectinas derivadas de plantas com característica de aglutinar células), possuem sítios hidrofóbicos de união, que podem ser divididos em três grupos. O primeiro está adjacente ao sítio de união aos carboidratos e é responsável pela afinidade 10 vezes maior destas lectinas pelos monossacarídeos que contém substituintes hidrofóbicos, que por aqueles que não os possuem. O segundo, situado a uma distância aproximada de 30 Å do sítio de união aos açúcares, tem uma baixa afinidade pelos ligandos hidrofóbicos. E o terceiro é um sítio de elevada afinidade pela adenina e seus derivados N-6 (incluídos um número de hormônios derivados da adenina, presentes nas plantas) (Hamelryck *et al.*, 1996).

Embora muitas lectinas reconheçam e se liguem a açúcares simples tais como glicose, manose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina ou fucose, a afinidade é muito maior para oligossacarídeos e constituintes de glicoproteínas como o ácido siálico e a N-acetilgalactosamina contendo cadeias de glicanos, encontrados em animais e seres humanos (Nicolson, 1974; Peumans & Van Damme, 1996; Peumans & Van Damme, 1998).

As aplicações biotecnológicas e atividades biológicas conhecidas desta classe de proteínas têm sido as mais diversas como: detecção e separação de glicoconjugados (Sarkar *et al.*, 1991); determinação de tipos sanguíneos (Khang *et al.*, 1990; Mo *et al.*, 2000); diagnóstico em processos de desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (Remani *et al.*, 1994); distinção entre o câncer de próstata e a neoplasia benigna deste órgão (Basu *et al.*, 2003); marcador de tecidos tumorais (Barou *et al.*, 2002); moléculas bioadesivas no endereçamento de drogas (Bies *et al.*, 2004); análise de imunoglobulinas humanas (Fassina *et al.*, 2001); ação inseticida contra larvas de insetos (Yáscara *et al.*, 2005); inibição do crescimento de fungos (Freire *et al.*, 2002); atividade antiproliferativa sobre células tumorais da leucemia (L1210 e M1) (Ngai & Ng, 2004); atividade antitumoral

(Andrade *et al.*, 2004); atividade mitogênica (Maciel *et al.*, 2004); atividade antiinflamatória (Santi-Gadelha *et al.*, 2006); indução de apoptose de células tumorais humanas (Karasaki *et al.*, 2001); atividade antibacteriana (Freire *et al.*, 2002; Wang & Ng, 2003); renovação de glicoproteínas do soro (Vijaya & Chandra, 1999); defesa contra patógenos (Chang & Zhu, 2002); proteínas de estocagem (Nakamura *et al.*, 2004); adsorção viral (Botos & Wlodawe, 2005); transporte de carboidratos (Kamiya *et al.*, 2005) e mediação de interações célula-célula e parasito-hospedeiro (Saouros *et al.*, 2005).

1.2. Cramoll

A *Cratylia mollis* (*Cmollis*), planta da família *Leguminosae*, tribo *Phaseolae*, subtribo *Diocleinae* tem a mesma família e mesmo grupo da Concanavalina A, Con A (lectina extraída das sementes de *Canavalia ensiformis*). *C. mollis* é típica da Região Semi-Árida do Estado de Pernambuco, onde é conhecida por feijão camaratu ou camaratuba. A lectina de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll) possui diferentes formas moleculares, isolectinas ou isoformas (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4), com especificidades distintas para monossacarídeos. Cramoll 1, Cramoll 2 e Cramoll 4 são específicas para glicose/manose, enquanto Cramoll 3 é específica para galactose. A Cramoll 1,4, uma preparação que contém Cramoll 1 e Cramoll 4, é também, glicose/manose específica (Paiva & Coelho, 1992; Correia & Coelho, 1995). Cramoll 1 já foi cristalizada (Tavares *et al.*, 1996) e totalmente seqüenciada (Souza *et al.*, 2003), mostrando uma homologia com a Con A de 80%, em sua estrutura primária. Estudos com Cramoll 1,4, revelaram: atividade antitumoral (Andrade *et al.*, 2004), atividade mitogênica (Maciel *et al.*, 2004), capacidade de caracterização de células transformadas malignamente (Beltrão *et al.*, 1998), bem como, sensibilidade eletroquímica (Souza *et al.*, 2003).

1.3. Purificação da Cramoll

O protocolo de purificação da Cramoll 1,4 foi estabelecido em 1995 por Correia & Coelho. O processo é iniciado com a preparação do extrato, onde as células em meio salino (solução de NaCl 0,15 M) são rompidas e as proteínas liberadas na solução (Kawagishi *et al.*, 2001; Mladenov *et al.*, 2002).

O fracionamento é feito a partir da adição de um sal, em virtude das proteínas possuírem água em sua superfície e muito grupos carregados. A solubilidade depende da concentração de sais dissolvidos, aumentando à proporção que os sais são adicionados (“*salting in*”) e voltando a diminuir à medida que os sais são adicionados (“*salting out*”), levando a precipitação da proteína. O sal mais utilizado para obtenção de lectinas é o sulfato de amônio, pois devido a sua alta solubilidade permite a precipitação protéica em soluções com elevada força iônica (Heu *et al.*, 1995; Santos Filho, 2001; Oliveira, 2006).

A separação dos componentes da mistura é feita por processos cromatográficos, em que estes se distribuem em duas fases, uma estacionária e outra móvel. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases de tal modo que alguns componentes são seletivamente retidos pela fase estacionária (Silva Jr., 2004).

A técnica de cromatografia por afinidade baseia-se na capacidade que certas moléculas têm de se ligarem especificamente a outras moléculas através de ligações não-covalentes. As lectinas ligam-se a carboidratos de colunas comerciais contendo polissacarídeos como o Sephadex (polímero de glicose), Sepharose (polímero de galactose), quitina (polímero de N-acetilglicosamina) e Sepharose conjugada com glicoproteína (Cavada *et al.*, 1998; Jimbo *et al.*, 2000; Freire *et al.*, 2002; Wang *et al.*,

2003; Gerlach *et al.*, 2002). Como a Cramoll 1 e Cramoll 1,4 são glicose/manose específicas, a coluna utilizada é a de Sephadex G-75 (Paiva & Coelho, 1992; Correia & Coelho, 1995).

1.4. Inflamação

Inflamação (do latim *inflammatio*, atear fogo) ou processo inflamatório é uma resposta dos organismos vivos homeotérmicos a uma agressão sofrida. Entende-se como agressão por qualquer processo capaz de causar lesão celular ou tecidual (Kumar *et al.*, 2005). A resposta inflamatória é um mecanismo que provoca alterações do sistema vascular, componentes líquidos e celulares, visando destruir, diluir ou isolar o agente lesivo, sendo assim uma reação de defesa e de reparação do dano tecidual (Gilman *et al.*, 2006; Rang *et al.*, 2004).

A inflamação pode ser aguda, com duração relativamente curta apresentando os eventos vasculares como exsudação plasmática e migração de neutrófilos; ou crônica, com duração mais longa e associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos e necrose tecidual (Rang *et al.*, 2004). Segundo Wanmacher & Ferreira (1999), a inflamação aguda refere-se à resposta inicial à lesão tecidual, sendo mediada pela liberação de mediadores químicos e, em geral, precede o desenvolvimento da resposta imune. Esta resposta acontece quando as células imunologicamente competentes são ativadas, reagindo a organismos estranhos ou substâncias antigênicas, liberadas durante a resposta inflamatória aguda ou crônica. O resultado da resposta imune pode ser benéfico para o hospedeiro, quando permite que o agente agressor seja fagocitado ou neutralizado, ou ser deletério, se resultar em inflamação crônica sem resolução do processo subjacente (Gilman *et al.*, 2006).

Os componentes básicos de um processo inflamatório envolvem eventos

irritativos, vasculares, exsudativos, celulares, mediadores derivados de células e indução da resposta imune (Rang *et al.*, 2004). Aqui vamos detalhar apenas o que ocorre nos fenômenos irritativos, vasculares e exsudativos, pois estão relacionados com o estudo em questão.

1.4.1. Fenômenos irritativos

Esta fase tem como característica, a produção ou a liberação de substâncias químicas diante da ação do agente inflamatório. Esses mediadores atuam na microcirculação do local lesado, desencadeando as características dos fenômenos vasculares (Rang *et al.*, 2004; Collins, 2001; Alencar *et al.*, 2007).

Os fenômenos irritativos estão intimamente ligados aos fenômenos vasculares, por envolverem a mediação química de fármacos que agem diretamente sobre a parede vascular, ocasionando as alterações vasculares (Corrêa, 2002). Autacóides como a histamina e a serotonina, considerados mediadores de ação rápida, e a plasmina, bradicinina, prostaglandina, tromboxano e leucotrienos, mediadores de ação prolongada agem promovendo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular (Rang *et al.*, 2004).

Frente a qualquer estímulo traumático, seja ele de origem química ou física, o lesionamento tecidual faz com que haja a ativação da enzima fosfolipase A2. Com sua ativação, o ácido araquidônico, ácido graxo transportado no sangue ligado à albumina, é liberado das membranas das células. Este ácido araquidônico, uma vez libertado da membrana fosfolipídica, é metabolizado por dois tipos de enzimas: a lipoxigenase, formando leucotrienos, e cicloxigenase-2 (COX-2), formando prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (Moncada & Vane, 1979; Samuelsson, 1983; Davies *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 2005).

1.4.2. Fenômenos vasculares

As modificações vasculares incluem alterações no leito vascular e no fluxo sanguíneo, o que origina diferentes formas de hiperemia, as quais são moduladas pela intensidade do agente agressor e pelos graus de respostas dos tecidos. Estas alterações consistem em dilatação vascular, aumento do fluxo sanguíneo local com conseqüente extravasamento de plasma e aumento da viscosidade do sangue (Rang *et al.*, 2004; Collins, 2001; Tedgui & Mallat, 2001).

1.4.3. Fenômenos exsudativos

Nestes fenômenos, ocorre a migração de líquidos e células para o foco inflamatório, que provêm de vasos ou tecidos vizinhos. São desencadeados dois tipos de exsudação: a) exsudação plasmática, caracterizada pela saída de plasma para fora da luz vascular, com quantidades diversas de água, eletrólitos e proteínas; b) exsudação celular, que é a passagem de células pela parede vascular em direção ao interstício, local onde o agente inflamatório atua. Pode ser denominada de fenômeno celular, pois envolve o acionamento das capacidades celulares de movimentação, adesão e de englobamento de partículas (Siqueira & Dantas, 2000; Rang *et al.*, 2004).

1.5. Antiinflamatórios

São drogas ou medicamentos capazes de interferir no processo reacional de defesa do organismo de modo a minimizar o dano (i.e. agressão por parte dos próprios tecidos frente ao agente agressor) e dar maior conforto ao paciente. Podem ser de natureza hormonal (antiinflamatórios esteróides) ou não-hormonal (antiinflamatórios não- esteróides e inibidores seletivos da cicloxigenase-2) (Collins, 2001).

1.5.1. Antiinflamatórios esteróides

Também conhecidos como glicocorticóides, corticóides ou corticosteróides, são

hormônios sintéticos que mimetizam ações do cortisol endógeno, hormônio secretado pela zona glomerular da glândula adrenal. Atuam inibindo a enzima fosfolipase A2, por meio da liberação de lipocortina-1 (mediador protéico antiinflamatório). O resultado final da ação destes antiinflamatórios é a parcial ou total redução da liberação das prostaglandinas e também dos leucotrienos. A lipocortina-1 atua por seqüestrar o substrato fosfolipídico e/ou inibir diretamente a enzima (Rhen & Cidlowski, 2005). Classifica-se de acordo com a duração de seu efeito em: ação curta (< 12 horas), por exemplo a hidrocortisona e cortisona; ação intermediária (18-36 horas), como a prednisolona, metilprednisolona e triancinolona; e de ação prolongada (36-54 horas), que são o grupo da betametasona, dexametasona e parametasona (De Bosscher & Haegeman, 2009).

1.5.2. Antiinflamatórios não-esteróides (AINEs)

Possuem propriedades analgésica, antitérmica, antiinflamatória e antitrombótica. Sua ação decorre da inibição da síntese de prostaglandina, efetuada mediante a inativação da cicloxigenase-1 (COX-1) ou constitutiva, e da cicloxigenase-2 (COX-2) ou induzível. A primeira é responsável pelos efeitos fisiológicos das prostaglandinas em sítios gástricos e renais. A segunda surge nos locais de inflamação. A inibição da COX-1 é, pelo menos em parte, responsável por alguns dos efeitos adversos dos AINEs, como as toxicidades renal e gastrointestinal. Desde o isolamento do ácido salicílico em 1828, os AINEs tornaram-se uma parte importante do tratamento da febre e da dor. Uma parte da sua popularidade deve-se a não causarem dependência ou depressão respiratória, ao contrário dos opióides. Ainda assim, não são desprovidos de efeitos secundários, sendo os mais comuns ao nível gastrintestinal. No início da década de 1990, a descoberta dos dois subtipos de COX criou expectativas quanto à criação de novos fármacos que

mantivessem as propriedades dos AINEs existentes e permitissem diminuir a incidência de efeitos colaterais (Lafont, 2007; Süleyman *et al.*, 2007; Antman *et al.*, 2007).

Fazem parte deste grupo medicamentos muito conhecidos, em parte por alguns já estarem disponíveis há muito tempo, por serem de venda livre e pelo vasto número de situações em que são usados. Alguns nomes sonantes incluem o ácido acetilsalicílico (Aspirina®) e ibuprofeno (Brufen®) (Khanapure *et al.*, 2007).

1.5.3. Inibidores seletivos da cicloxigenase-2 (COXIBs)

Os antiinflamatórios do grupo dos COXIBs, dos quais permanecem em comercialização o celecoxib (Celebra®) e o etoricoxib (Arcoxia®), entraram no mercado a partir de 1999 na tentativa de solucionar os problemas dos efeitos adversos trazidos pelos AINEs, como alternativas vantajosas para pacientes com problemas gastrintestinais. Foram apresentados como medicamentos seletivos, inibidores específicos da COX-2, com potencial antiinflamatório e analgésico equivalente ao dos AINEs sem provocar os efeitos gastrintestinais e renais daqueles, pois preservariam a COX-1 (Kummer & Coelho, 2002; Carvalho *et al.*, 2004). Embora toda expectativa em torno dessa nova classe de medicamentos (visto que os AINEs situam-se dentre as drogas mais prescritas em todo o mundo), vários estudos clínicos trouxeram novo olhar sobre este grupo. As limitações referem-se à elevação do risco de eventos adversos cardiovasculares, especialmente ao aumento da incidência de infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC). Esses fatos levaram à retirada do mercado o rofecoxib (Vioxx®), em 2004, o valdecoxib, em sua apresentação oral (Bextra®), em 2005, e por último o lumiracoxib (Prexige®), em julho de 2008 (Araújo *et al.*, 2005; Gross *et al.*, 2007).

Dez anos após a introdução destes medicamentos no mercado, foi possível

verificar que a inibição da COX-2 e manutenção da COX-1, para quem precisa usar AINEs por um tempo maior (um ano ou mais) mostrou, através de vários estudos clínicos, um aumento significativo da incidência de eventos trombóticos agudos. Assim, constatou-se que a ativação da COX-1 – protetora da mucosa gástrica – também é responsável por efeitos vaso-oclusivos, como agregação plaquetária, vasoconstrição e proliferação do músculo liso no interior dos vasos sanguíneos. E que a COX-2 é responsável também por vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e da proliferação de músculo liso vascular. É possível então visualizar que o mecanismo dos COXIBs (inibição da COX-2 / preservação da COX-1) pode prejudicar o mecanismo do endotélio contra a agregação plaquetária, favorecendo o desenvolvimento de trombos cardíacos e suas conseqüências (Garcia Rodriguez *et al.*, 2008; Minuz, 2008) . Outro fato importante, embora ainda não conclusivo, é a interação medicamentosa prejudicial entre a aspirina (em sua utilização como anti-agregante plaquetário) e os inibidores (especialmente os não-seletivos) da COX. Pode ocorrer uma competição entre a aspirina e o antiinflamatório pelos sítios de ligação com a enzima, levando a um bloqueio do acesso da aspirina aos seus locais de ligação, prejudicando o seu efeito cardioprotetor (Arehart *et al.*, 2008).

1.6. Justificativa

Vários medicamentos industrializados têm sido desenvolvidos a partir das plantas medicinais (Silva *et al.*, 2000; Villas Boas & Gadelha, 2007; Pupo *et al.*, 2007). Uma grande diversidade de fármacos tem sido obtida pela extração direta do vegetal, sendo em sua maioria antiinflamatórios, analgésicos, vitaminas, hormônios e substâncias ativas no sistema nervoso central. Os antiinflamatórios são os melhores exemplos da grande relação entre processos primitivos de seleção de plantas medicinais,

a farmacologia e a química moderna. A papaína, enzima alcalóide obtida do látex do mamoeiro (i.e. *Carica papaya*), tem sido utilizada como agente antiinflamatório *in natura*, em creme ou liofilizada, dissolvida em solução fisiológica (Batistuzzo *et al.*, 2002). A bromelina, complexo enzimático de proteinases extraído dos vegetais da família *Bromeliaceae*, do qual o abacaxi é o mais conhecido e rico nesta protease, tem sido usado nas preparações farmacêuticas industriais, como cápsulas digestivas e antiinflamatório (Wen *et al.*, 2006). A escina, saponina presente na semente da castanheira, *Aesculus hippocastanum*, inibe a formação de edema e diminui a fragilidade vascular. Como produto de uso farmacêutico apresenta-se em diferentes formas, possui grande utilidade e várias apresentações, uma delas é como composto ativo na formulação do Repail® Gel (Sirtori, 2001).

O interesse sobre as lectinas na investigação científica se deve às diversas atividades biológicas a elas atribuídas (Sharon & Lis, 2004). Estudos demonstraram atividade antiinflamatória em lectinas isoladas das sementes de *Lonchocarpus sericeus* (Poir.) (Mota, 2008), *Dioclea violácea* (Dviol), *Dioclea guianensis* (DguiL), *Dioclea grandiflora* (DgL), *Cratylia floribunda* (CfL), *Dioclea violacea* (D.vL), *Dioclea virgata* (DvirL), *Canavalia brasiliensis* (ConBr) (Assreuy *et al.*, 1997) e na lectina extraída da *Canavalia ensiformes* (Concanavalina A ou Con A) (Bento *et al.*, 1993; Tsuji *et al.*, 1995; Conchon-Costa *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2008).

As descobertas quanto à contribuição de glicoconjugados da superfície celular e carboidratos que se ligam a proteínas para processos inflamatórios têm motivado a criação de glicoconjugados sintéticos ou lectinas como candidatas para futuras gerações de drogas terapêuticas (Ilarregui *et al.*, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiinflamatória da preparação contendo a lectina de sementes de *C. mollis* (Cramoll 1,4) em camundongos da espécie *Mus musculus*, machos e fêmeas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter preparações contendo a lectina de sementes de *C. mollis* de acordo com o protocolo estabelecido por Correia & Coelho (1995) utilizando cromatografia de afinidade em Sephadex G-75.
- Induzir do processo inflamatório pela injeção intramuscular de 100 µl de solução de carragenina a 0,1%, na pata posterior de cada animal.
- Tratar do processo inflamatório utilizando ácido acetilsalicílico (7,5 mg/animal), Cramoll 1,4 (200, 500 e 1000 µg/animal), Con A (200 µg /animal) ou NaCl 0,15M.
- Avaliar o edema inflamatório através da pesagem das patas dos camundongos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, N. M. N.; CAVALCANTE, C. F.; VASCONCELOS, M. P.; LEITE, K. B.; ARAGÃO, K. S.; ASSREUY, A. M. S.; NOGUEIRA, N. A. P.; CAVADA, B. S.; VALE, M. R. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57(4), n° 7, p. 919-922, 2005.
- ALENCAR, N. M.; ASSREUY, A. M.; HAVT, A.; BENEVIDES, R. G.; DE MOURA, T. R.; DE SOUZA, R. B.; RIBEIRO, R. A.; CUNGHA, F. Q.; CAVADA, B. S. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, n°4, p. 275-282, 2007.
- ALVES, R.; SILVA, D. A. O.; FERNANDES, J. F.; ALMEIDA, K. C.; YNOUE, L. H.; BERNARDES, C. T.; MOREIRA, P. F. S.; CARDOSO, M. L. G.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Humoral and cellular immune responses to *Blomia tropicalis* and concanavalin A binding fractions in atopic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 773-781, 2008.
- ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS MAGALHÃES, N. S. A. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435-445, 2004.
- ANTMAN, E. M.; BENNETT, J. S.; DAUGHERTY, A.; FURBERG, C.; ROBERTS, H.; TAUBERT, K. A. Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs:

an update for clinicians: a scientific statement from the American Heart Association.

Circulation, v.115, p.1634-1642, 2007.

- ARAÚJO, L. F.; SOEIRO, A. M.; FERNANDES, J. L.; SERRANO JUNIOR, C. V. Eventos cardiovasculares: um efeito da classe dos inibidores de COX-2. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, p. 222-229, 2005.

- AREHART, E.; STITHAM, J.; ASSELBERGS, F. W.; DOUVILLE, K.; MACKENZIE, T.; FETALVERO, K. M.; GLEIM, S.; KASZA, Z.; RAO, Y.; MARTEL, L.; SEGEL, S.; ROBB, J.; KAPLAN, A.; SIMONS, M.; POWELL, R. J.; MOORE, J. H.; RIMM, E. B.; MARTIN, K. A.; HWA, J. Acceleration of cardiovascular disease by a dysfunctional prostacyclin receptor mutation: potential implications for cyclooxygenase-2 inhibition. **Circulation Research**, v. 102, p. 986-993, 2008.

- ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; SOUZA, M. L. P. D.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n° 3, p. 201-210, 1997.

- BAROU, O.; MEKRALDI, S.; VICO, L.; BOIVIN, G.; ALEXANDRE, C.; LAFAGEPROUST, M. H. Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study. **Bone**, v. 30, n° 4, p. 604-612, 2002.

- BASU, P. S.; MAJHI, R.; BATABYAL, S. K. Lectin and serum-PSA interaction as a screening test for prostate cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 36, p. 373-376, 2003.

- BATISTUZZO, J. A. O.; ITAYA, M.; ELO, Y. **Formulário Médico Farmacêutico**. 2º ed. São Paulo: Tecnopress. p. 53-65. 2002.
- BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, p. 125-132, 1998.
- BENTO, C. A. M.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Inflammation Research**, v. 38, nº 1, p. 48-54, 1993.
- BRINDA, K. V.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. **Biochemical Journal**, v. 391, p. 1-15, 2005.
- BIES, C.; LEHR, C. M.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 435, 2004.
- BOTOS, I.; WLODAWE, A. Proteins that bind high-mannose sugars of that HIV envelope. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 88, p. 233-289, 2005.
- BUTS, L.; DAO-THI, M. H.; LÓRIS, R.; WYNS, L.; ETZLER, M.; HAMELRYCK, T. Weak protein-protein interactions in lectins: the crystal structure of a vegetative lectin from the legume *Dolichos biflorus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 193-201, 2001.
- CARVALHO, A. C.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da cicloxigenase-2: avanços terapêuticos.

Revista Brasileira de Anestesiologia, v. 54 (3), p. 448-464, 2004.

- CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANJEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUZA, F. A. M.; CRISOSTOMO, C. V. CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v. 49, p. 675-680, 1998.

- CHANG, T. J.; ZHU, Z. Plant lectin and its application in insect-resistant plant genetic engineering. **Yin Chuan**, v. 24, p. 493-500, 2002.

- COELHO, L. C. B. B.; DA SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 1-6, 2000.

- CONCHON-COSTA, I.; LOYOLA, W.; GAZIRI, L. C. J.; CUSTODIO, L. A.; FELIPE, I. Low dose of concanavalin-A enhances innate immuneresponse and prevents liver injury in mice infected with *Candida albicans*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 49, p. 330-336, 2007.

- CORRÊA, A. L. **Fenômenos irritativos**. Disponível em: <<http://www.usp.br/fo/lido/patoartegeral/patoarteinfe4.htm#histamin>>. Acesso em: 27 jun. 2002.

- CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261-267, 1995.

- CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic?. In: Yasir Hasan Siddique. (Org.). **Recent Trends in Toxicology**, v. 37, p. 47-59, 2008.

- COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS, S. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 44-100. 2001.
- COUTIÑO-RODRIGUEZ, R.; HERNÁNDEZ-CRUZ, P.; GILES-RÍOS, H. Lectins in fruits having gastrointestinal activity: their participation in the hemagglutinating property of *Escherichia coli*. **Archives of Medical Research**, v. 32, p. 251-257, 2001.
- DAVIES, P.; BAILEY, P. J.; GOLDENBERG, M. M.; FORD-HUTCHINSON, A. W. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 2, p. 335-357, 1984.
- DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. **Molecular Endocrinology**, v. 23(3), p. 281-291, 2009.
- DIAZ, P. H.; GONZALEZ, O. M.; VÉLEZ, Y. R. P.; BÁEZ, F. A. G. Aplicaciones de las lectinas. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v.15, n° 2, p. 91-95, 1999.
- DRICKAMER, K.; TAYLOS, M. E. Evolving views of protein glycosylation. **Trends Biochemistry Science**, v. 23(9), p. 321-324, 1998.
- FASSINA, G.; RUVO, M.; PALOMBO, G.; VERDOLIVA, A.; MARINO, M. Novel ligands for affinity-chromatographic purification of antibodies. **Journal Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, p. 481-490, 2001.
- FAVACHO, A. R. M.; CINTRA, E. A.; COELHO, L. C. B. B.; LINHARES, M. I. S. In vitro activity evaluation of *Parkia pendula* seed lectin

against *Human Cytomegalovirus* and *Herpes Virus 6*. **Biologicals (London)**, v. 35, p. 189-194, 2007.

- FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. N.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; DESIMONE, S. G.; NOVELL, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisa esculente* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

- GARCIA RODRIGUEZ, L. A.; TACCONELLI, S.; PATRIGNANI, P. Role of dose potency in the prediction of risk of myocardial infarction associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the general population. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52(20), p. 1628-1636, 2008.

- GERLACH, D.; WAGNER, M.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U. Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 10579, p. 61-68, 2002.

- GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E.; HARDMAN, J. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11^a ed. São Paulo: Ed. Interamericana. 1671 p. 2006.

- GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

- GROSS, S.; TILLY, P.; HENTSCH, D.; VONESCH, J. L.; FABRE, J. E. Vascular wall-produced prostaglandin E2 exacerbates arterial thrombosis and atherothrombosis through platelet EP3 receptors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 311-320, 2007.

- HAMELRYCK, T. W.; DAO-THI, M. H.; POORMANS, F.; CHRISPPEELS, M. J.; WYNS, L.; LORIS R. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 20479-20485, 1996.
- HEU, M. S.; KIM, H. R.; PYEUN, J. H. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy *Engraulis japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 112 (B), n° 3, p. 557-567, 1995.
- ILARREGUI, J. M.; BIANCO, G. A.; TOSCANO, M. A.; RABINOVICH, G. A. The coming of age of galectins as immunomodulatory agents: impact of these carbohydrate binding proteins in T cell physiology and chronic inflammatory disorder. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, p. 96-103, 2005.
- JIMBO, M.; YANOHARA, T.; KOIRE, K. ; SAKAI, R.; MURAMOTO, K. ; KAMIYA, H. The galactose binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationships to the symbiotic dinoflagellates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.125 (B), p. 227-236, 2000.
- KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, Y.; TAKAHASHI, N.; ARANATA, Y.; KASAI, K.; IHARA, Y.; MATSUO, I.; ITO, Y.; YAMAMOTO, K.; KATO, K. Sugar-binding properties of VIP36, an intracellular animal lectin operating as a cargo receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 37178-37182, 2005.
- KARASAKI, Y.; TSUKAMOTO, S.; MISZUSAKI, K.; SUGIURA, T.; GOTOH, S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in

human tumor cells. **Food Research Internacional**, v. 34, p. 7-13, 2001.

- KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T.
Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides
aitchisonii*. **Phytochemistry**, v.56, p. 53-58, 2001.

- KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; COREIA, M. T. S.;
CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of
recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

- KHANAPURE, S. P.; GARVEY, D. S.; JANERO, D. R.; LETTS, L. G.
Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology and therapeutic frontiers.
Current Topic in Medicinal Chemistry, v.7 (3), p. 311-340, 2007.

- KHANG, N. G.; JEAN-LEUE, G.; JOHAN, H. A blood group A specific
from the seeds of *Crotalaria striata*. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v.1033,
n° 2, p. 210-213, 1990.

- KRISTENSEN, A. K. Protein expression and purification. **Papers to
Appear in Forthcomming Issues**, v.16, 2001.

- KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não-
esteróides inibidores da COX-2: aspectos atuais. **Revista Brasileira de
Anestesiologia**, v. 52 (4), p. 498-512, 2002.

- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO N. **Robbins e Cotran-
Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7° ed. Rio de Janeiro : Elsevier, p. 112-
123, 2005.

- LAFONT, O. From the willow to aspirin. **Revue d'histoire de la
pharmacie**, v. 55 (354), p. 209-216, 2007.

- LEE, Y.; RODRIGUEZ, C.; DIONNE, R. A. The role of COX-2 in acute pain and the use of selective COX-2 inhibitors for acute pain relief. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, n° 14, p. 1737-1755, 2005.

- LÓRIS, R. Principles of structures of and animal lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 198-208, 2002.

- LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v.1383, p. 9-36, 1998.

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

- MANCINI FILHO, J.; LAJOLO, F. M.; VIZEU, D. M. Lectins from red kidney beans: radiation effect on agglutinating and mitogenic activity. **Journal of Food Science**, v. 44, n° 4, p. 1194-1196, 1200, 1979.

- MINUZ, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk: is prostacyclin inhibition the key event? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52 (20), p. 1637-1639, 2008.

- MLADENOV, I. V.; HARALAMBIEVA, I. H.; LANKO, I. D.; MITOV, I. G. Characterization of 20-kDa lectin-spermagglutination from *Arum maculatum* that prevents *Chlamydia pneumoniae* infection of L-929 fibroblast cells. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 1386, p. 1-6, 2002.

- MO, H.; WINTER, H. C.; GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a Neu5calpha2-6Galbeta1-4Glc/GINA-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **The Journal of**

Biological Chemistry, v. 275, p. 10623-10629, 2000.

- MONCADA, S.; VANE, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, tromboxane A₂ and prostacyclin. **Pharmacological Reviews**, v. 30, n° 3, p. 293-331, 1979.

- MONZO, A.; BONN, G. K.; GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26 (5), p. 23-43, 2007.

- MOREIRA, R. A.; SOUSA-CAVADA, B.; OLIVEIRA, J. T. A.; AINOUIZ, I. L. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 86 (2), p. 211-218, 1991.

- MOTA, M. R. L. **Estudo da atividade antitumoral e antinociceptiva da lectina isolada de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (Poir.)**. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. 139f. 2008.

- NASCIMENTO, C. O.; COSTA, R. M. P. B.; ARAÚJO, R. M. S.; CHAVES, M. E. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; TEIXEIRA, J. A.; CORREIA, M. T. S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Optimized extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark using AOT in isooctane reversed micelles. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 779-782, 2008.

- NAKAMURA, S.; IKEGAMI, A.; MIZUNO, M.; YAGI, F.; NOMURA, K. The expression profile of lectin differs from that of seed storage proteins in *Catanea crenata* trees. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, p. 698-705, 2004.

- NGAI, P. H.; NG, T. B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes and antiproliferative activity toward tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, p. 988-993, 2004.
- NICOLSON, G. L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. **International Review of Cytology**, v. 39, p. 89-190, 1974.
- OLIVEIRA, M. M. **Extração, isolamento e caracterização parcial de lectinas de folhas de *Bauhinia variegata* var. “candida”**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas. Bioquímica. 2006.
- PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (*Camaratu bean*). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.
- PAIVA, P. M. G.; OLIVA, M. L. V.; FRITZ, H.; COELHO, L. C. B. B.; SAMPAIO, C. A. M. Purification and primary structure determination of two Bowman-Birk type trypsin isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds. **Phytochemistry**, v. 67, p. 545-552, 2006.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends Food Science Technology**, v. 7, n° 4, p. 132-138, 1996.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspective in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199-228, 1998.

- PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. *Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais*. **Química Nova**, v. 30, n° 6, 2007.
- PUSZTAI, A. **Plant Lectins**. Cambridge University Press, p. 39-43, 1991.
- RANG, H. P.; DALLE, M. M.; RITTER, J. M.; MOOR, P. K. **Farmacologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 640-665, 2004.
- REMANI, P.; PILLAI, K. R.; HASEENABEEVI, V. M.; ANKAYHIL, R. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. **Neoplasma**, v. 41, p. 39-42, 1994.
- RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs. **The New England Journal of Medicine**, v. 353(16), p. 1711-1723, 2005.
- SAMUELSSON, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science**, v. 220, p. 568-575, 1983.
- SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. A.; ARAGÃO, K. S.; OLIVEIRA, C. C.; MOTA, M. R. L.; GOMES, R. C.; PIRES, A. F.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O. ; ALENCAR, N. M. N.; CRIDDLE, D. N.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (*Araucariaceae*) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n° 4, p. 1050-1055, 2006.
- SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A.; ARGOLO, A. C. C.; TEIXEIRA, J. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 01, p. 01-10, 2009.

- SANTOS FILHO, T. G. **Isolamento de glicoproteínas através de cromatografia de afinidade em colunas contendo lectinas imobilizadas.** Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas. Bioquímica. 2001.
- SAOUROS, S.; EDWARDS-JONES, B.; REISS, M.; SAWMYNADE, K.; COTA, E.; SIMPSON, P.; DOWSE T. J.; JAKLE, U.; RABOARINA, S.; SHIVARATTAN, T.; MATTHEWS, S.; SOLDATI- FAVRE, D. A novel galactin-like domain from *Toxoplasma gondii* micronemal protein 1 assists the folding, assembly and transport of a cell adhesion complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 38583-38591, 2005.
- SARKAR, M.; MAJUMDER, G. C.; CHATTERJEE, T. Goat sperm membrane lectin binding sites of sperm surface and lectin affinity-chromatography of the mature sperm membrane antigens. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 1070, n° 1, p.196-204, 1991.
- SCHWARTZ, F. P.; SUROLIA, A.; BHAT, R. G.; PURIT, K. D. Thermodynamics of monosaccharide binding to Concanavalina A Pea (*Pisum sativum*) lectin and lentil (*Lens culinaris*) lectin. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 268 (11), p. 7668-7677, 1993.
- SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analysis of carbohydrates recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, p. 433-445, 1997.
- SHARON, N. Lectin-carbohydrates complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends Biochemistry Science**, v. 18, p. 221-226, 1993.

- SHARON, N.; LIS, H. Lectins-protein with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays in Biochemistry**, v. 30, p. 50-75, 1995.
- SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.
- SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. Heidelberg: Springer. 2^a. ed. 470 p., 2004.
- SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. Flavonal glycoides from *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 87-92, 2000.
- SILVA JR., J. G. **Cromatografia de proteínas: guia prático e teórico**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, p. 57-59, 2004.
- SILVA, M. D. C.; SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D. L.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 334-340, 2009.
- SIQUEIRA, J. F. JR.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: MEDSI, 238 p., 2000.
- SIRTORI, C. R. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. **Pharmacological Research**, v. 44 (3), p. 183-193, 2001.
- SOUZA, G. A.; OLIVEIRA, P. S. L.; TRAPANI, S.; SANTOS, A. C. O.; ROSA, J. C.; LAURE, H. J.; FAÇA, V. M.; CORREIA, M. T. S.; TAVARES, G. A.; OLIVA, G.; COELHO, L. C. B. B.; GREENE, L. J. Amino acid sequence

- tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. **Glycobiology**, v. 23, p. 961-972, 2003.
- SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. **Pharmacological Reports**, v. 59 (3), p. 247-258, 2007.
 - TAVARES, G. A.; CARACELLI, I.; BURGER, R.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; OLIVA, G. Crystallization and preliminary X-ray studies on the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*. **Acta Crystallographica**, v. 52, p. 1046-1047, 1996.
 - TEDGUI, M.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circulation Research**, v. 88, p. 877-887, 2001.
 - TSUJI, R. F.; YAMAKOSHI, J.; URAMOTO, M.; KOSHINO, H.; SAITO, M.; KIKUCHI, M.; MASUDA, T. Anti-inflammatory effects and specificity of L-156,602: comparison of effects on concanavalin A and zymosan-induced foot pad edema and contact sensitivity response. **Immunopharmacology**, v. 29, n° 1, p. 79-87, 1995.
 - VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 707-714, 1999.
 - VILLAS BOAS, G. K.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n° 6, 2007.
 - YÁSCARA, F. M. M. L.; SILVA, L. M. C. M. ; AMORIM, R. C. N.;

FREIRE, E. A.; JORGE, D. M. M.; GRANGEIRO, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera bruchidae). **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 1724, p. 137-145, 2005.

- WANG, H. X.; NG, T. B. Purification of *Castamollin*, a novel antifungal protein Chinese Chestnuts. **Protein Expression & Purification**, v. 32, p. 44-51, 2003.

- WANMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica para Dentistas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p. 99-103, 1999.

- WEN, S.; HUANG, T. H. W.; LI, G. Q.; YAMAHARA, J.; ROUFOFALIS, B. D.; LI, Y. Bromelain improves decrease in defecation in postoperative rats: modulation of colonic gene expression of inducible nitric oxide synthase. **Life Sciences**, v. 35, p. 995-1002, 2006.

- WU, A. M.; WU, J. H.; TSAI, M. S.; HERP, A. Carbohydrate specificity of a lectin isolated from the root of *Trichosanthes kirilowii*. **Life Science**, v. 66, p. 2571-2581, 2001.

4. ARTIGO

Artigo a ser submetido ao periódico *Applied Biochemistry and Biotechnology*

**ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF LECTIN PREPARATIONS
FROM *Cratylia mollis* SEEDS IN MICE**

Fabiana B. Melo^{a,*}, Maria Tereza Jansem de Almeida Catanho^b, Maria Tereza S. Correia^a, Luana Cassandra B. B. Coelho^a

^a*Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Brasil.*

^b*Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Brazil.*

* Correspondence with the Author- phone: (+81) 37211748.

E-mail address: lcbcoelho@gmail.com (L.C.B.B. Coelho).

SUMMARY

Cramoll is a purified lectin of the seeds of *Cratylia mollis*. The objective of this work was to evaluate the anti-inflammatory activity of Cramoll 1,4 (preparation containing Cramoll 1 and Cramoll 4) in mice. Cramoll 1,4 was obtained initially from the fractionation of the seed extract in ammonium sulphate, followed by affinity chromatography on Sephadex G-75. The inflammation was induced by carrageenan in the posterior paw of the animals. After 30 min, the animals were treated with Cramoll 1,4 (200, 500 and 1000 µg/animal), concanavalin A (200 µg/animal; lectin controls), salicylic acetyl acid (7.5 mg/animal; positive control), or 0.15 M NaCl (negative control). After 4 h, the animals were euthanized and the paws weighed. The results showed that Cramoll was dependent upon the dosage administered and the reduction of the extent of the paw edema was more effective in male mice (83.6 and 94.2%, 500 and 1000 µg/animal, respectively) in relation to the females (46.4%, and 73.9%, 500 and 1000 µg/animal, respectively). In the male animals, when the dosage of Cramoll 1,4 and Con A (200 µg/animal) was utilized the reduction was 76.2 and 75.1%, respectively. The analysis showed that all the preparations with lectin were more effective than control acetylsalicylic acid with the exception of the concentration of 200 µg/animal, in the females, there was a reduction of only 18.8%.

Word-key: lectin; *Cratylia mollis*; Cramoll; anti-inflammatory activity; acetyl salicylic acid.

1. Introduction

Lectin is a type of protein or glycoprotein of non-immunological origin, that possesses two or more connection locations capable of interacting, in a reversible way, with carbohydrates or glycoconjugates (Goldstein *et al.*, 1980; Sharon & Lis, 2004) as free sugars, residues of polysaccharides, carbohydrates, glycoproteins or glycolipids, that can be free or conjugated to the membranes of cells (Monzo *et al.*, 2007). Lectin is found in a wide variety of species of superior vegetables, algae, mushrooms, vertebrate and spineless animals, bacteria and viruses (Lóris, 2002; Sharon & Lis, 2004; Alencar *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2009). In the plant kingdom lectin is present in larger amounts in legume grains and grasses (Mancini Filho *et al.*, 1979; Pusztai, 1991), but they are also abundant in fibrous vegetables such as roots, leafs, stalks, beans, fruit, seeds, flowers and peel (Coelho & Silva, 2000; Wu *et al.*, 2001; Coutiño-Rodríguez *et al.*, 2001; Nascimento *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009). The lectin of legume derivatives are the most studied and characterized (Sharon, 1993; Cavada *et al.*, 1998; Paiva *et al.*, 2006; Favacho *et al.*, 2007). The molecular structure of lectin can differ, especially with respect to its specialized interaction with carbohydrates and biological activities (Sharon & Lis, 2004; Correia *et al.*, 2008).

The specialization of lectins varies greatly amongst its varied interactions (Sharma & Surolia, 1997), specifically conditioned by the structural variability of the union locations (Sharon, 1993) and the existence of close sub-locations to the union locations with respect to carbohydrates (Hamelryck *et al.*, 1996; Loris *et al.*, 1998). The biotechnical applications and biological activities of this class of proteins have been the most diverse known (Oliveira *et al.*, 2008; Sá *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009).

Cramoll is a purified lectin of the seeds of *Cratylia mollis*, plant of the family

Phaseolae, sub-family *Diocleinae* that belongs to the same family and the same group as *Canavalia ensiformis*, of which concanavalin A (Con A) is extracted. The *Cratylia mollis* is typically found in the Semi-Arid Region of the State of Pernambuco, where it is known as the camaratu or camaratuba bean. Cramoll possesses different molecular forms, isolectin or isoforms (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 and Cramoll 4), with different specifications for monosaccharides. Cramoll 1, Cramoll 2 and Cramoll 4 are specific to glucose / mannose, while Cramoll 3 is specific to galactose (crystallized sugar). Cramoll 1,4, a preparation that contains Cramoll 1 and Cramoll 4, is also specific to glucose / mannose (Paiva & Coelho, 1992; Correia & Coelho, 1995). Cramoll 1 was already crystallized (Tavares *et al.*, 1996) and totally sequenced (Souza *et al.*, 2003), showing a homology with Con A of 80%, in its primary structure. Studies completed with Cramoll 1 and Cramoll 1,4 revealed antitumor activity (Andrade *et al.*, 2004), mitochondrial / mito-genetic activity (Maciel *et al.*, 2004), the capacity of characterization of malignantly transformed cells (Beltrão *et al.*, 1998), as well as a sensibility to electrochemistry (Souza *et al.*, 2003).

The objective of this work was to evaluate the anti-inflammatory activity of Cramoll 1,4 in mice of the species *Mus musculus* male and female.

2. Materials and methods

2.1. Obtaining *Cratylia mollis* seed lectin

Cramoll 1,4 was isolated in agreement with the established protocol by Correia & Coelho (1995) as showed in figure 1. Cramoll 1,4 was obtained by extraction in 0.15 M NaCl (10% p/v), for 4 h, at 4° C, followed by saline fractionation in ammonium sulphate, saturation 40-60% (F-40-60). This fraction was dialyzed in 0.15 M NaCl for 24 h, 4 °C and subjected to affinity chromatography on Sephadex G-75 (Sigma) in a column (1,9 x 70,0 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl. The lectin elution was made with a solution of 0.3 M D-

glucose, with subsequent dialysis in 0.15 M NaCl (Cramoll 1,4). Concanavalin A (Con A) (Sigma), was used as an international standard lectin.

2.2. Analysis of anti-inflammatory activity

The analysis for the evaluation of the anti-inflammatory activity was the measurement of the paw edema induced initially by carrageenan in mice described by Levy (1969), modified by Hadjipavlou-Litina *et al.* (1999).

2.2.1 Animals

Sixty six adult mice of the species *Mus musculus*, 36 males and 30 females were used weighing approximately 30 g.

2.2.2 Induction of the inflammatory process

The acute inflammatory process was induced by the intramuscular injection of 100 µl of a solution of carrageenan Lambda (Sigma) to 0.1%, in the posterior paw of each animal (6 animals per group).

2.2.3. Treatment and evaluation of the inflammatory process

After 30 min from the induction of the inflammation, each animal group was treated with an intra-parietal injection of acetyl salicylic acid (ASA, 7.5 mg/animal; positive control) or Cramoll 1,4 (200, 500 and 1000 µg/animal), Con A (200 µg /animal; lectin control) and 0.15 M NaCl (negative control). The animals were euthanized with ether, 4 h after the injection of these products the paws were incised in the truncal area and weighed. The results were expressed as the percentile of the reduction of the edema when compared with the positive control (acetylsalicylic acid, ASA).

3. Results

The results showed that Cramoll was dependent upon the dosage and the reduction of the extent of the paw edema and was more effective in male mice (83.6 and 94.2%, 500 and 1000 µg/animal, respectively) in relation to the females (46.4%, and 73.9%, 500 and 1000 µg/animal, respectively). In the male animals Cramoll 1,4 and Con A (200 µg/animal) resulted in a reduction of 76.2 and 75.1%, respectively (Figures 2 and 3).

For ASA (standard treatment) the reduction was of 54.4% in the male mice and of 38.4% in the females. The analysis showed that all the preparations with lectin were more effective than ASA, except for the concentration of 200 µg/animal, for the females, in that there was a reduction of only 18.8%.

4. Discussion

The procedure of lectin isolation involves, in general, the extraction stages of the protein, followed by the treatment of the extract with ammonium sulphate and the chromatographic method, affinity chromatography, a technique that explores the biological activities for the adsorption of the molecule to a solid phase. This has been used thoroughly for lectin purification. Affinity chromatography is an effective technique in lectin isolation, providing homogeneous protein-filled preparations (Oliveira *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009). As Cramoll 1,4 is a glucose / mannose specific lectin, the column used for its purification is one of Sephadex G-75 (Correia & Coelho, 1995). In this work we obtained a yield in proteins of 11%, a value considered satisfactory.

In 1971 the American doctor John Vane discovered that drugs that contained ASA inhibited the synthesis of prostate-specific antigens responsible for covalently blocking the enzyme cyclooxygenase (COX) of the types 1 and 2. COX-2 has important part to play in the

generation of the inflammation. It is the enzyme that turns the araquidonic acid into the mediators for inflammatory proteolytic enzymes, and to some degree prostate-specific antigens. These mediators are important in almost all the phenomena associated to the inflammation, such as the dilation of vessels, the experience of pain and leukocyte attraction to the location. Besides inhibiting the prostate-specific antigen production, salicylates are effective in neutralizing the free radicals, molecules produced in the inflammation and highly noxious to the tissue. ASA is one of the anti-inflammatory medications most prescribed in medicine and it is the drug test for use in pharmacological analysis of the evolution of new drugs (Gilman *et al.*, 2006).

Con A is the lectin most studied, with well known characteristics, inclusive of its relationship with anti-inflammatory activity in studies with regards to the edemas of the paws of mice (Bento *et al.*, 1993; Tsuji *et al.*, 1995; Conchon-Costa *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2008). The proximity of the values obtained for the reduction of the inflammatory edema among Con A and Cramoll 1,4, in the same concentrations, confirms the anti-inflammatory properties of Cramoll 1,4. The use of Con A in the experiment was limited to the male mice, for a just treatment of comparative standard.

The intramuscular injection of carrageenan induces an acute and progressive increase of the volume of the paw of the animals. The edema, is proportional to the intensity of the inflammatory response, and then establishes a useful parameter in the evaluation of the anti-inflammatory activity (Pereira *et al.*, 2006; Pereira, 2004). The edema provoked by the carrageenan happens in three phases, according to Di Rosa *et al.* (1971). In the first hour after the carrageenan injection, the increase of the vascular permeability is mediated by histamine and serotonin. In the second hour, the increase of the permeability is mediated by cyanines. The phase of the greatest intensity of growth of the edema happens 3 h after the

carrageenan injection and it is characterized by the activation of COX-2 and the prostate-specific antigen action on the permeability of the capillary (Di Rosa & Willoughby, 1971; Salvemini *et al.*, 1996; Huntjens *et al.*, 2005). The studies showed that the preparations containing Cramoll were capable of reducing the edema of the paw showing anti-inflammatory activity and anti-edema genesis.

References

- Alencar, N. M. N.; Cavalcante, C. F.; Vasconcelos, M. P.; Leite, K. B.; Aragão, K. S.; Assreuy, A. M. S.; Nogueira, N. A. P.; Cavada, B. S.; Vale, M. R., 2005. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 57 (4), n° 7, p. 919-922.
- Alves, R.; Silva, D. A. O. ; Fernandes, J. F.; Almeida, K. C.; Ynoue, L. H.; Bernardes, C. T.; Moreira, P. F. S.; Cardoso, M. L. G.; Sung, S. J.; Taketomi, E. A., 2008. Humoral and cellular immune responses to *Blomia tropicalis* and concanavalin A binding fractions in atopic patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, p. 773-781.
- Andrade, C. A. S.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; Nascimento, S. C.; Santos Magalhães, N. S. A., 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 435-445.
- Beltrão, E. I. C.; Correia, M. T. S.; Figueredo-Silva, J.; Coelho, L. C. B. B., 1998. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.74, p. 125-132.
- Bento, C. A. M.; Cavada, B. S.; Oliveira, J. T. A. ; Moreira, R. A.; Barja-Fidalgo, C.,

1993. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. *Inflammation Research*. v. 38, n° 1, p. 48-54.

- Cavada, B. S.; Santos, C. F.; Granjeiro, T. B.; Nunes, E. P.; Sales, P. V. P.; Ramos, R. L.; De Souza, F. A. M.; Crisostomo, C. V.; Calvete, J. J., 1998. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry*, v. 49, p. 675-680.

- Coelho, L. C. B. B.; Da Silva, M. B. R., 2000. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, v. 11, p.1-6, 2000.

- Conchon-Costa, I.; Loyola, W.; Gaziri, L. C. J.; Custodio, L. A.; Felipe, I., 2007. Low dose of Concanavalin-A enhances innate immuneresponse and prevents liver injury in mice infected with *Candida albicans*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 49, p. 330-336.

- Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B., 1995. Purification of glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 55, p. 261-267.

- Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; Paiva, P. M. G., 2008. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic?. In: Yasir Hasan Siddique. (Org.). *Recent Trends in Toxicology*, v. 37, p. 47-59.

- Coutiño-Rodríguez, R.; Hernández-Cruz, P.; Giles-Ríos, H., 2001. Lectins in fruits having gastrointestinal activity: their participation in the hemagglutinating property of *Escherichia coli*. *Archives of Medical Research*, v. 32, p. 251-257.

- Di Rosa, M.; Willoughby, D. A., 1971. Screens of anti-inflammatory drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 23, n° 4, p. 297-298.

- Di Rosa, M.; Willoughby, D. A.; Giroud, J. P., 1971. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *Journal of Pathology*, v. 104, n° 1, p. 15-29.
- Favacho, A. R. M.; Cintra, E. A.; Coelho, L. C. B. B.; Linhares, M. I. S., 2007. In vitro activity evaluation of *Parkia pendula* seed lectin against *Human Cytomegalovirus* and *Herpes Virus 6*. *Biologicals (London)*, v. 35, p. 189-194.
- Gilman, A. G.; Limbird, L. E.; Hardman, J., 2006. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11ª. ed. São Paulo : Ed.Interamericana.1671 p.
- Goldstein, I. J.; Hughes, R. C.; Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N., 1980. What should be called a lectin? *Nature*, v. 285, p. 66.
- Hamelryck, T. W.; Dao-Thi, M. H.; Poormans, F.; Chrispeels, M. J.; Wyns, L.; Loris R., 1996. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 20479-20485.
- Huntjens D. R.; Danhof, M.; Della Pasqua, O. E., 2005. Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations end biomarkers in the development of COX-2 inhibitors. *Rheumatology (Oxford)*, v. 44, n° 7, p. 846-859.
- Hadjipavlou-Litina, D.; Geronikaki, A.; Mgonzo, R.; Doytchinova, I., 1999. Thiazolyl-N-substituted amides : a group of effective anesthetic properties, synthesis biological evaluation and a QSAR approach. *Drug Development Research*, v. 48, p. 53-60, 1999.
- Levy, L., 1969. Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Science*, v. 8, p. 601-606.
- Lóris, R., 2002. Principles of structures of animal lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1572, p. 198-208.
- Loris, R.; Hamelryck, T.; Bouckert, J.; Wyns, L., 1998. Legume lectin structure.

Biochemistry and Biophysical Acta, v. 1383, p. 9-36.

- Maciel, E. V. M.; Araújo-Filho, V. S.; Nakazawa, M.; Gomes, Y. M.; Coelho, L. C. B. B.; Correia, M. T. S., 2004. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*, v. 32, p. 57-60.
- Mancini Filho, J.; Lajolo, F. M.; Vizeu, D. M., 1979. Lectins from red kidney beans: radiation effect on agglutinating and mitogenic activity. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 44, n° 4, p. 1194-1196.
- Monzo, A.; Bonn, G. K.; Guttman, A., 2007. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26 (5), p. 23-43.
- Nascimento, C. O.; Costa, R. M. P. B.; Araújo, R. M. S.; Chaves, M. E. C.; Coelho, L. C. B. B.; Paiva, P. M. G.; Teixeira, J. A.; Correia, M. T. S.; Carneiro-da-Cunha, M. G., 2008. Optimized extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark using AOT in isooctane reversed micelles. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 779-782.
- Oliveira, M. D. L.; Andrade, C. A. S.; Santos Magalhães, N. S. M.; Coelho, L. C. B. B.; Teixeira, José A. C.; Carneiro-da-Cunha, M. G.; Correia, M. T. S., 2008. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology*, v. 46, p. 371-376.
- Paiva, P. M. G.; Coelho, L. C. B. B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 36, p. 113-118.
- Paiva, P. M. G.; Oliva, M. L. V.; Fritz, H.; Coelho, L. C. B. B.; Sampaio, C. A. M., 2006. Purification and primary structure determination of two Bowman-Birk type trypsin isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds. *Phytochemistry*, v. 67, p. 545-552.

- Pereira, F. E. L., 2004. Inflamações. In: Brasileiro Filho, G. Bogliolo-Patologia Geral. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.130.
- Pereira, M. M.; Souza Júnior, S. N.; Alcântara, A. F. C.; Piló-Veloso, D.; Alves, R. B.; Machado, P. O.; Azevedo, A. O.; Moreira, F. H.; Castro, M. S. A.; Raslan, D. S., 2006. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (*Apocynaceae*). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 8, nº 3, p. 1-8.
- Pusztai, A., 1991. Plant Lectins. Cambridge University Press, p. 39-43.
- Sá, R. A.; Napoleão, T. H.; Santos, N. D. L.; Gomes, F. S.; Albuquerque, A. C.; Xavier, H. S.; Coelho, L. C. B. B.; Bieber, L. W.; Paiva, P. M. G., 2008 . Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (*Isoptera: Termitidae*) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. International Biodeterioration and Biodegradation, v. 62, p. 460-464.
- Salvemini, D.; Wang, Z-Q.; Wyatt, P. S.; Bourdon, D. M.; Marina, M. H.; Manning, P. T.; Currie, M. G., 1996. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. British Journal of Pharmacology, v.118, p. 829-838.
- Santos, A. F. S.; Luz, L. A.; Argolo, A. C. C.; Teixeira, J. A.; Paiva, P. M. G.; Coelho, L. C. B. B., 2009. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. Process Biochemistry, v. 01, p. 01-10.
- Sharma, V.; Surolia, A., 1997. Analysis of carbohydrates recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. Journal of Molecular Biology, v. 267, p. 433-445.
- Sharon, N., 1993. Lectin-carbohydrates complexes of plants and animals: an atomic view. Trends Biochemistry Science, v. 18, p. 221-226.

- Sharon, N.; Lis, H., 2004. Lectins. Heidelberg: Springer. 2^a. ed. 470 p.
- Silva, M. D. C.; Sá, R. A.; Napoleão, T. H.; Gomes, F. S.; Santos, N. D. L.; Albuquerque, A. C.; Xavier, H. S.; Paiva, P. M. G.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B., 2009. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). International Biodeterioration and Biodegradation, v. 63, p. 334-340.
- Souza, G. A.; Oliveira, P. S. L.; Trapani, S.; Santos, A. C. O.; Rosa, J. C.; Laure, H. J.; Faça, V. M.; Correia, M. T. S.; Tavares, G. A.; Oliva, G.; Coelho, L. C. B. B.; Greene, L. J., 2003. Amino acid sequence tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. Glycobiology, v. 23, p. 961-972.
- Tavares, G. A.; Caracelli, I.; Burger, R.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; Oliva, G., 1996. Crystallization and preliminary X-ray studies on the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*. Acta Crystallographica, v. 52, p.1046-1047.
- Tsuji, R. F.; Yamakoshi, J.; Uramoto, M.; Koshino, H.; Saito, M.; Kikuchi, M.; Masuda, T., 1995. Anti-inflammatory effects and specificity of L-156,602: comparison of effects on concanavalin A and zymosan-induced foot pad edema and contact sensitivity response. Immunopharmacology, v. 29, n° 1, p. 79-87.
- Wu, A. M.; Wu, J. H.; Tsai, M. S.; Herp, A., 2001. Carbohydrate specificity of na agglutinin isolated from the root of *Trichosanthes kirilowii*. Life Science, v. 66, p. 2571-2581.

LIST OF CAPTIONS

Figure 1. Protocol to obtain Cramoll 1,4.

Figura 2. Anti-inflammatory activity of preparations of the seed lectin of *Cratylia mollis* in male mice: 1- negative control (0.15 M NaCl); 2- positive control (acetyl salicylic acid, 7.5 mg/animal); 3- Cramoll 1,4 (200 µg/animal); 4- Cramoll 1,4 (500 µg/animal); 5- Cramoll 1,4 (1000 µg/animal); 6- Con A (200 µg/animal).

Figura 3. Anti-inflammatory activity of preparations of the lectin of *Cratylia mollis* in females mice: 1- negative control (0.15 M NaCl); 2- positive control (acetylsalicylic acid, 7.5 mg/animal); 3- Cramoll 1,4 (200 µg/animal); 4- Cramoll 1,4 (500 µg/animal); 5- Cramoll 1,4 (1000 µg/animal).

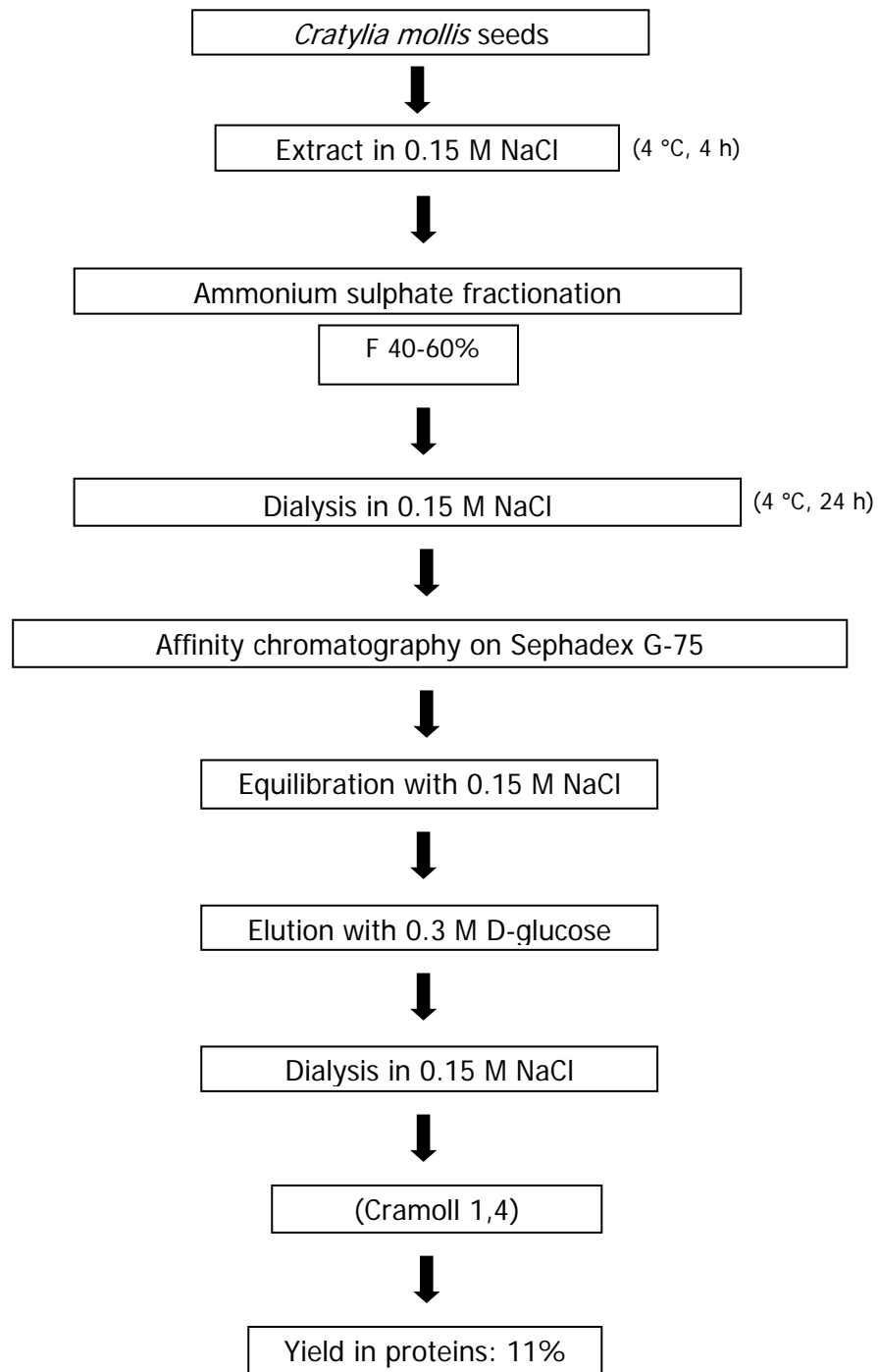


Figure 1. Protocol to obtain Cramoll 1,4.

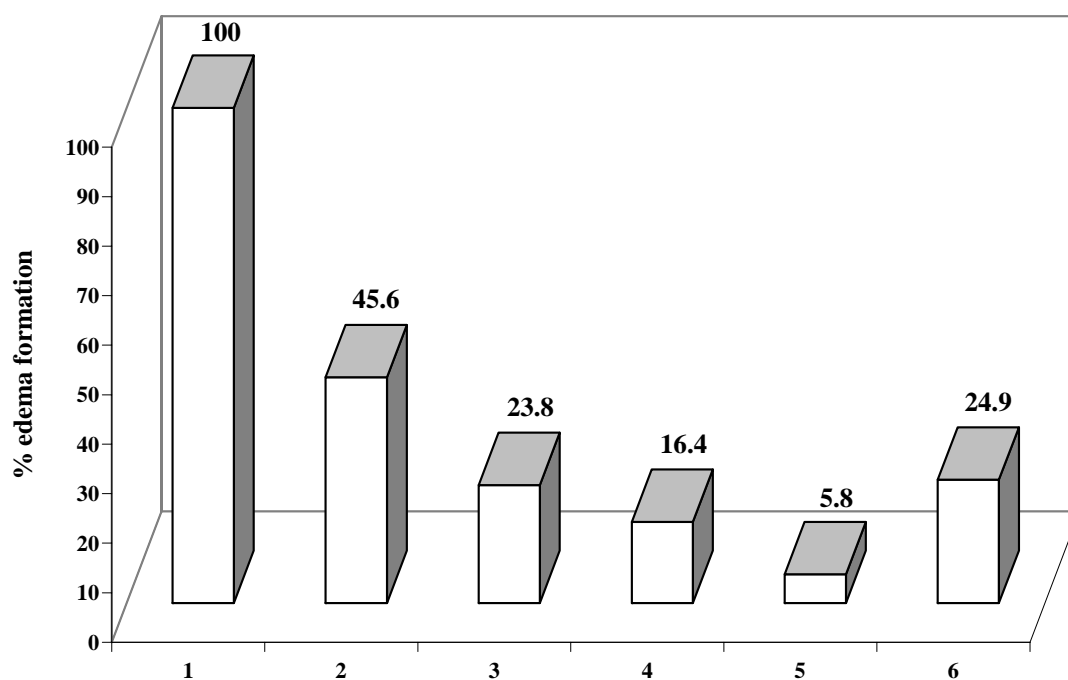


Figure 2. Anti-inflammatory activity of preparations of the seed lectin of *Cratylia mollis* in male mice: 1- negative control (0.15 M NaCl); 2- positive control (acetylsalicylic acid, 7.5 mg/animal); 3- Cramoll 1,4 (200 µg/animal); 4- Cramoll 1,4 (500 µg/animal); 5- Cramoll 1,4 (1000 µg/animal); 6- Con A (200 µg/animal).

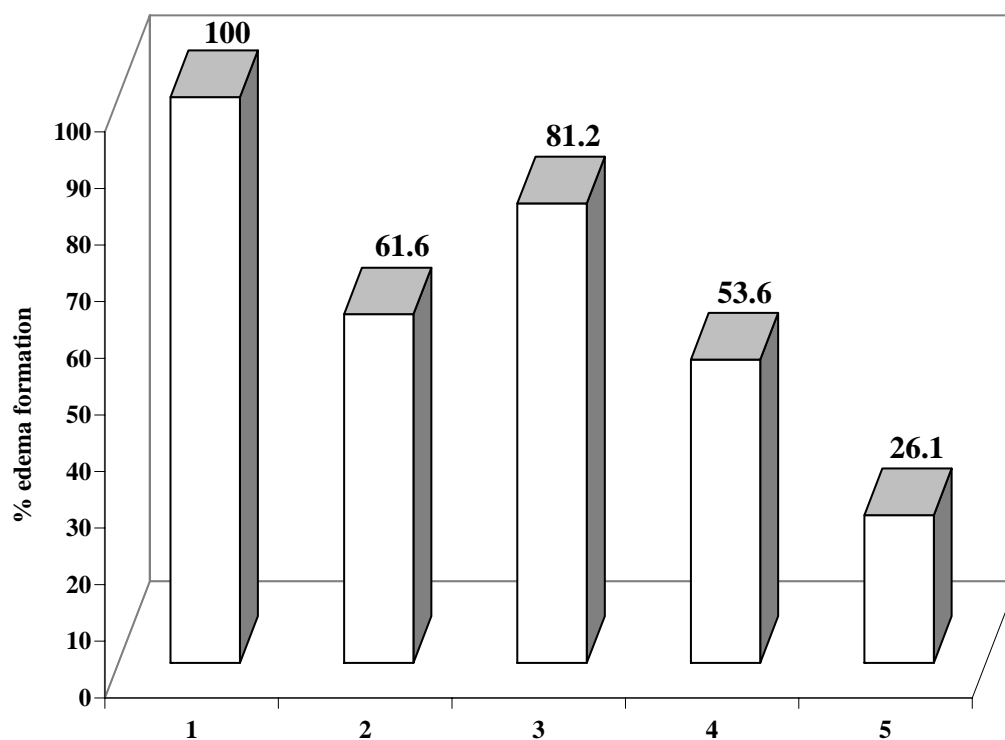


Figure 3. Anti-inflammatory activity of preparations of the seed lectin of *Cratylia mollis* in females mice: 1- negative control (0.15 M NaCl); 2- positive control (acetylsalicylic acid, 7.5 mg/animal); 3- Cramoll 1,4 (200 µg/animal); 4- Cramoll 1,4 (500 µg/animal); 5- Cramoll 1,4 (1000 µg/animal).

5. CONCLUSÃO

- Os estudos mostraram que as preparações contendo *Cramoll* foram capazes de reduzir o edema da pata mostrando atividade antiinflamatória e antiedematogênica.