



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS - CCAA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCAM

ANA LÚCIA ESTEVAM DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA LECTINA MANOSE
LIGANTE OBTIDA DAS SEMENTES DE *Machaerium acutifolium* VOGEL**

Chapadinha/MA

2021

ANA LÚCIA ESTEVAM DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA LECTINA MANOSE LIGANTE
OBTIDA DAS SEMENTES DE *Machaerium acutifolium* VOGEL**

Dissertação de mestrado submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais.

Linha de pesquisa: Bioprospecção de produtos naturais

Orientador: Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira.

Chapadinha/MA

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Estevam dos Santos, Ana Lúcia.

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA LECTINA MANOSE
LIGANTE OBTIDA DAS SEMENTES DE *Machaerium acutifolium*
VOGEL / Ana Lúcia Estevam dos Santos. - 2021.

53 p.

Orientador(a): Claudener Souza Teixeira.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências Ambientais, Universidade Federal do Maranhão,
Universidade Federal do Maranhão, 2021.

1. Hemaglutininas. 2. Inflamação. 3. LPS. 4.
Machaerium sp. 5. MaL. I. Souza Teixeira, Claudener. II.
Título.

ANA LÚCIA ESTEVAM DOS SANTOS

**AValiação DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA LECTINA MANOSE LIGANTE
OBTIDA DAS SEMENTES DE *Machaerium acutifolium* VOGEL**

Dissertação de mestrado submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais. Linha de pesquisa: Bioprospecção de produtos naturais.

Aprovada em: 10/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Cariri - UFCA

Dr.^a Racquel Oliveira da Silva Souza
Universidade Federal do Cariri - UFCA

Prof.^a Dr.^a Raquel Guimarães Benevides
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

*“Olhe para cima, para as estrelas; e não para baixo,
para os seus pés. Tente achar sentido no que você vê
e se pergunte sobre o que faz o Universo existir.”*

Stephen Hawking

*À minha mãe,
Solange Estevam dos Santos,
pelo amor, apoio, fé e orações.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder o dom da vida e o amor a ela.

À minha família, em especial a minha mãe, Solange, meu padrasto, Carlos, meu irmão Henrique e minhas irmãs, Carol e Paula, por sempre torcerem por mim, lembrando-me sempre a ser uma pessoa melhor e ajudando-me a superar todas as dificuldades.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira, por todos os ensinamentos transmitidos, por me dar a oportunidade de contribuir com a ciência, por toda confiança e pela grande inspiração, tanto acadêmica como humana. Agradeço imensamente por tudo!

Ao Laboratório de Farmacologia e Química Molecular - LFQM (URCA-CRATO-CE), em nome do Prof. Dr. Irwin Menezes, Cícero Pedro, Maria Oliveira, Lindaiane Dantas e Tarcísio Silva, meu muito obrigada.

Ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia das Infecções Respiratórias – LIMIR (Universidade CEUMA), em nome do Prof. Dr. Eduardo Martins Sousa, Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho e Roberval Moraes, agradeço por todo apoio prestado.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular - LaBEM, Karla, Renato, Évelyn, Professora Daniele, Valdenice e em especial à Helena e Romério (Obrigada por tudo, e por todo apoio, risos e cafés), obrigada pela ajuda e amizade, é um prazer trabalhar com vocês.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – PPGCAM, representada pelo Prof. Ricardo, Prof. Samuel, Dona Fátima e Brígida, por toda orientação e paciência, agradeço igualmente a todos os professores que compõem o corpo docente do PPGCAM, pelos ensinamentos.

Aos amigos do “PPGCAM-ZUEIRA”, Augusto, Geolane, Juliana, Rakel, Renato, Rosa e Wanderson, por todo companheirismo nesses dois anos de mestrado, por todos os dias de luta (Só quem viveu sabe kk), os dias de glória estão chegando!

A todos os funcionários do FINEP e do Prédio da Biologia, em nome do Sr. Pires e Sr. Gilberto, pela recepção, cuidado e manutenção do espaço.

À banca examinadora pelo aceite do convite.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão – FAPEMA, pela concessão da bolsa de pesquisa e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento parcial desta pesquisa.

RESUMO

A reação inflamatória consiste em uma resposta do organismo na presença de uma infecção ou lesão, mediada por substâncias químicas que reconhecem o estímulo lesivo a fim de destruí-lo. Agentes vegetais têm sido bastante estudados por possuírem maior segurança, melhor eficácia e uma forma mais econômica de tratar a inflamação, sendo assim, estudos com lectinas, um grupo de proteínas de origem não imune que possuem a capacidade de se ligar a carboidratos de forma seletiva e reversível, têm mostrado serem importantes na área médica, química e biológica, tendo em vista a importância dos carboidratos nos processos biológicos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito anti-inflamatório da lectina obtida das sementes de *Machaerium acutifolium* (MaL) em modelos de camundongos com inflamação aguda e crônica e modelos de macrófagos estimulados por LPS. A fração proteica obtida foi utilizada para purificação em cromatografia de afinidade, seguida de cromatografia de troca iônica. Para avaliar atividade anti-inflamatória foi realizado ensaios *in vivo* utilizando camundongos Swiss machos (20-30), para a fase aguda foi feito o teste de formalina. Realizou-se modelos de edema de pata e peritonite, junto com a determinação de migração de leucócitos. A inflamação crônica foi avaliada por ensaios de granuloma. Foi realizado ensaios *in vitro*, usando macrófagos RAW 264.7 para verificar a citotoxicidade da MaL, assim como quantificação de citocinas por meio do plaqueamento das células tratadas com MaL (0,02 mg/kg, 1 mg/kg e 5 mg/kg). A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi realizado usando o instrumento QuantStudioFlex6 K. A MaL reduziu significativamente o tempo de lambe as patas dos camundongos no teste de formalina, tanto na fase neurogênica (42.64 %, 68.40 % e 59.35 %), como na fase inflamatória (50.64 %, 67.84 % e 65.60 %). No edema de pata induzido por carragenana, a MaL inibiu o curso temporal do edema induzido por carragenana (300 µg/pata; sc) em todas as doses testadas (0,02 mg/kg, 1 mg/kg e 5 mg/kg) e no modelo induzido por dextrano apresentou uma redução nas porcentagens do edema (41,13%). No teste de inflamação aguda induzida por carragenana no peritônio, a MaL (1,0 mg/kg) reduziu 68% da contagem de leucócitos. A MaL (1,0 mg/kg) reduziu o extravasamento de albumina induzida por carragenana em 34%. No ensaio de citotoxicidade a MaL não reduziu a viabilidade celular em células RAW 264.7 a uma concentração de 31,25 µg/mL. Além disso, pode-se observar atividade da MaL na modulação de citocinas (TNF- α , IL-10, TLR2/4 e iNOS). Sendo assim, a MaL possui atividade anti-inflamatória *in vivo* e *in vitro*.

Palavras-chave: *Machaerium sp.*; MaL; Hemaglutininas; Inflamação; LPS; Modulação.

ABSTRACT

The inflammatory reaction consists of a response of the organism in the presence of an infection or injury, mediated by chemical substances that recognize the harmful stimulus as an end of destruction. Vegetable agents have been studied because they have greater safety, better efficacy, and a more economical way to treat inflammation, therefore, studies with lectins, a group of proteins of non-immune origin that have a capacity to selectively bind to carbohydrates and reversible, must be important in the medical, chemical and biological fields, in view of the importance of carbohydrates in biological processes. Therefore, the aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory effect of lectin obtained from *Machaerium acutifolium* (MaL) seeds in mouse models with acute and chronic inflammation and models of macrophages stimulated by LPS. The protein fraction obtained was used for purification in affinity chromatography, followed by ion-exchange chromatography. To analyze the purity of the active fraction, they were subjected to electrophoresis under denaturing conditions. In order to assess the anti-inflammatory activity, in vivo tests were performed using male Swiss mice (20-30), for an acute phase, the formalin test was performed. Paw edema and peritonitis models were performed, along with the determination of leukocyte migration. Chronic inflammation was assessed by granuloma tests. In vitro assays were performed, using RAW 264.7 macrophages to check the cytotoxicity of MaL, as well as quantification of cytokines by plating cells treated with MaL (0.02 mg/kg, 1 mg/kg, and 5 mg/kg). A real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed using the QuantStudioFlex6 K (Applied Biosystems) instrument. MaL significantly reduced the time to lick the mice's paws in the formalin test, both in the neurogenic phase (42.64%, 68.40%, and 59.35%) and in the inflammatory phase (50.64%, 67, 84%, and 65.60%). In carrageenan-induced paw edema, MaL inhibited the time course of carrageenan-induced edema (300 µg / paw; sc) at all doses tested (0.02 mg/kg, 1 mg/kg, and 5 mg/kg) and in the model induced by dextran, it presents a reduction in the edema percentages (41.13%). In the test of acute inflammation induced by carrageenan in the peritoneum, MaL (1.0 mg/kg) reduced 68% of the leukocyte count. MaL (1.0 mg/kg) reduces carrageenan-induced albumin leakage by 34%. In the cytotoxicity assay, MaL did not reduce cell viability in RAW 264.7 cells to a concentration of 31.25 µg / mL. In addition, one can observe the activity of MaL in the modulation of cytokines (TNF- α , IL-10, TLR2 / 4, and iNOS). Thus, MaL has anti-inflammatory activity in vivo and in vitro.

Keywords: *Machaerium* sp.; MaL; Hemagglutinins; Inflammation; LPS; Modulation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
MaL	Lectina de <i>Machaerium acutifolium</i>
PPL	Lectina de <i>Parkia platycephala</i>
VML	Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>
DVL	Lectina de <i>Dioclea violacea</i>
ConBr	<i>Lectina de Canavalia brasiliensis</i>
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
Eutirucalina	Lectina de <i>Euphorbia tirucalli</i>
CNA	Lectina de <i>Clathrotropis nitida</i>
UDA	Lectina de <i>Urtica dioica</i>
CaBo	Lectinas de <i>Canavalia bonariensis</i>
Cvill	Lectinas de <i>Canavalia villosa</i>
LAL	Lectina de <i>Lonchocarpus araripensis</i>
DrfL	Lectina de <i>Dioclea reflexa</i>
CoxyL	Lectina de <i>Canavalia oxyphylla</i>
PBL	Lectina de <i>Parkia biglobosa</i>
AFAL	Lectina de <i>Acacia farnesiana</i>
DwL	Lectina de <i>Dioclea wilsonii</i>
CFL	Lectina de <i>Cratylia floribunda</i>
DguiL	Lectina de <i>Dioclea guianensis</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
RRP	Receptores de reconhecimento de padrões
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll-like</i>
APCs	Células apresentadoras de antígenos
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal
TNF	Fator de necrose tumoral
IL	Interleucina
AA	Ácido araquidônico
PAMP	Moléculas-padrão associadas a patógenos
DAMP	Moléculas-padrão associadas a dano tecidual
IgE	Imunoglobulina E
IFN- γ	Interferon-gama

TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
MCP	Proteína 1 quimioatraente de macrófagos
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófagos 1 α
RANTES	Regulated on activation normal T expressed and secreted
TXA	Tromboxano
PGI	Prostaglandina
LT	Leucotrienos
COX	Ciclooxigenase
ERO	Espécies reativas de oxigênio
NOX	NADPH oxidase
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
Con A	<i>Concanavalina A</i>
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
Abu	Ácido aminobutírico
GalNac	N-Acetilgalactosamina
kDa	Quilodalton
TRPV1	Receptor vanilóide de potencial transitório 1
LPS	Lipopolissacarídeo
CEUA	Comitê para o uso ético dos animais
URCA	Universidade Regional do Cariri
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
PAGE	Eletroforese em gel e poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
i.p	Intraperitoneal
PBS	Phosphate-Buffered Saline
MPO	Mieloperoxidase
SEM	Erro padrão da média
DEAE	Dietilaminoetil celulose
g	Gramas
h	Horas
mg	Miligramas

mg mL ⁻¹	Miligramas por mililitros
Min	Minutos
L	Litros
mL	Mililitros
mL min ⁻¹	Mililitros por minutos
nm	Nanômetros
pH	Potencial de hidrogênio
μL	Microlitros
μG	Microgramas

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
\pm	Mais-menos
$\%$	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$<$	Menor
μ	Micro

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

Tabela 1. Estudos de atividades biológicas de lectinas 30

Tabela 2. Lectinas no processo inflamatório. 32

CAPÍTULO 2 – *Machaerium acutifolium* lectin inhibits inflammatory responses through cytokine modulation

Table 1 Primers used in RT-qPCR 151

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

Figura 1. Reações celulares e vasculares da inflamação aguda.....	22
Figura 2. Mecanismos de migração dos leucócitos através dos vasos sanguíneos e os papéis das citocinas na inflamação aguda.....	23
Figura 3. Grupos de lectinas vegetais de acordo com os domínios de reconhecimento a carboidratos	30
Figura 4. <i>Machaerium acutifolium</i> (A) Folha com folículos (B) Inflorescência pêndula (C) Semente tipo sâmara alada (D) Flor.	34

CAPÍTULO 2 – *Machaerium acutifolium* lectin inhibits inflammatory responses through cytokine modulation

Fig. 1. Effect of MaL on the formalin test. Values represent the arithmetic mean \pm S.E.M. (standard error of the mean). One-way ANOVA followed by the Tukey test. a4: $p < 0.0001$ vs. saline; a3: $p < 0.001$ vs. saline; a2: $p < 0.01$ vs. saline.....	152
Fig. 2. Effect of MaL on paw edema induced by carrageenan. Values represent the arithmetic mean \pm S.E.M. (standard error of the mean). Two-way ANOVA followed by the Tukey test. T1: 1 h after induction; T2: 2 h after induction; T3: 3 h after induction; T4: 4 h after induction. a4: $p < 0.0001$ vs. saline; a3: $p < 0.001$ vs. saline; a2: $p < 0.01$ vs. saline.....	152
Fig. 3. Effect of MaL on paw edema induced by dextran. Values represent the arithmetic mean \pm S.E.M. (standard error of the mean). Two-way ANOVA, followed by the Tukey test. T1: 1 h after induction; T2: 2 h after induction; T3: 3 h after induction; T4: 4 h after induction. a4: $p < 0.0001$ vs. saline; a3: $p < 0.001$ vs. saline; a2: $p < 0.01$ vs. saline.....	152
Fig. 4. Effect of MaL on the percentage of leukocytes (lymphocytes) and on vascular permeability. Values represent the arithmetic mean \pm S.E.M. (standard error of the mean). (A) Percentage of lymphocytes. (B) Dosage of MPO in peritoneal fluid. One-way ANOVA, followed by the Tukey test. a2: $p < 0.01$ vs. saline; a3: $p < 0.001$ vs. saline	153
Fig. 5. Effect of MaL on protein extravasation in carrageenan-induced peritonitis. a4: $p < 0.0001$ vs. carrageenan and a3: $p < 0.001$ vs. carrageenan. ANOVA, followed by the Tukey test.....	153

Fig. 6. Effect of MaL on granuloma. Values represent the arithmetic mean \pm S.E.M. (standard error of the mean). (A) Mass of the pellets. (B) Total proteins (absorbance of pellet homogenate). One-way ANOVA, followed by the Tukey test. a2: $p < 0.01$ vs. saline; a3: $p < 0.001$ vs. saline. 154

Fig. 7. Cell viability effects of MaL. Cell viability of MaL lectin towards RAW 264.7 cells determined by MTT assay after 24 h of incubation. Values represent the arithmetic mean \pm S.E.M. (standard error of the mean) of the results in triplicate. *Group shows a significant difference ($p < 0.05$) from the Medium group by Student's t-test, and #group shows a significant difference ($p < 0.05$) from all other groups. 154

Fig. 8. Modulation of host cytokine gene expression in RAW 264.7 cells stimulated with LPS and MaL. The mRNA was extracted after 24 h of culture. Levels of mRNA were quantified by real-time PCR using gene-specific primers for cytokine genes. Differences in gene expression are represented by $\Delta\Delta C_t$ values of three biological and three technical replicates.* $p < 0.05$ for ANOVA (non-parametric) test. ** $p < 0.01$ for ANOVA (*non-parametric*) test. 155

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	18
1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	19
2.1 Resposta imunitária.....	19
2.2 Inflamação.....	20
2.2.1 Eventos vasculares e celulares	21
2.2.2 Mediadores inflamatórios.....	24
2.3 Aspectos históricos das lectinas	26
2.4 Lectinas de leguminosas	28
2.5 Aspectos estruturais das lectinas	28
2.6 Atividades biológicas de lectinas	30
2.6.1 Lectinas e atividade inflamatória	31
2.7 A lectina de <i>Machaerium acutifolium</i>	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos Específicos.....	35
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 2 – <i>Machaerium acutifolium</i> lectin inhibits inflammatory responses through cytokine modulation	44

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 INTRODUÇÃO

A inflamação pode ser entendida como uma reação do organismo na presença de uma infecção ou lesão dos tecidos por meio da liberação de mediadores químicos [1] agindo no sentido de reconhecer o agente/estímulo lesivo, para destruí-lo ou inibi-lo, desencadeando uma série de eventos de ativação e amplificação do sistema imune, resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores na tentativa de promover o retorno do tecido danificado à condição normal [2], a inflamação é, portanto, um mecanismo crucial de defesa, do sistema imunológico, para a saúde do organismo. Mas, ao ocorrer uma lesão tecidual ocasionada por bactérias, traumatismo, substâncias químicas, calor ou qualquer outro fenômeno, e os eventos anti-inflamatórios não ocorrerem de maneira eficiente e sincronizada, pode resultar em danos teciduais persistentes e até mesmo decomposição fisiológica, disfunção e morte dos órgãos [3].

Embora exista um grande avanço no desenvolvimento de drogas terapêuticas ainda há uma grande procura por medicamentos que possuem efeitos colaterais minimizados. Sabe-se que o uso prolongado de anti-inflamatórios como os inibidores de ciclooxigenase e corticoides, estão associados a inúmeros efeitos colaterais, por exemplo, drogas esteroides podem causar atrofia adrenal, osteoporose, supressão de resposta a infecção ou lesão [4]. E os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) estão associados a graus variados de risco cardiovascular [5] e gastrointestinal (como úlceras pépticas), além de efeitos renais adversos podem causar broncoespasmo devido ao bloqueio de prostaglandinas fisiológicas e inflamatórias e produção simultânea de leucotrienos [6,7].

A busca por novos agentes anti-inflamatórios de fontes vegetais têm ficado popular com o objetivo de obter maior segurança, melhor eficácia e uma maneira mais econômica de tratar inflamação [8] e a inibição da produção de mediadores inflamatórios é um importante alvo terapêutico para a cura de doenças relacionadas à inflamação [9].

Sendo assim, os estudos com lectinas, um grupo de proteínas amplamente distribuídas e estruturalmente heterogêneas de origem não imune e que possuem ao menos um domínio não catalítico que reconhece seletivamente e liga-se reversivelmente a açúcares ou glicanos livres específicos presentes nas glicoproteínas e glicolipídios sem alterar a estrutura do carboidrato [10], têm mostrado serem importantes instrumentos em diversas áreas da ciência, em especial, em processos médicos, químicos e biológicos [11], visto que os glicanos estão envolvidos em diversas funções fisiológicas importantes como reconhecimento célula-célula, sinalização

celular, reconhecimento de patógeno-hospedeiro, desenvolvimento de doenças, metástase, mobilização e localização intracelular [12]. Essas moléculas são encontradas em vários grupos de organismos: vírus, bactérias, plantas, fungos, insetos e animais e podem ser identificadas por meio de sua capacidade de aglutinação de células [13].

Lectinas de vegetais podem ser extraídas de diversas partes da planta como folhas [14], frutos [15], raízes de algumas Convolvulaceae [16] e tubérculos [17], porém, são mais abundantes nas sementes de leguminosas [18]. Devido à alta concentração proteica nas sementes, esse grupo de lectinas são as mais bem caracterizadas, a nível funcional e molecular, contribuindo assim com o desenvolvimento de diversas pesquisas na área da lectinologia [19]. Além disso, lectinas vegetais são geralmente de baixo custo e o processo de obtenção, frequentemente, demanda de um ou dois passos de purificação.

A lectina de *Machaerium acutifolium* (MaL) é uma lectina manose/*N*-acetil-D-glicosamina específica que apresenta efeito antinociceptivo via receptor TRPV1 [20] e atividade antifúngica contra *Candida parapsilosis* [21]. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito anti-inflamatório da lectina obtida das sementes de *Machaerium acutifolium* em modelos de camundongos com inflamação aguda e crônica e modelos de macrófagos estimulados por LPS.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Resposta imunitária

A reação inflamatória é um dos constituintes mais importante da execução da resposta imunitária, onde a resposta imune é apresentada morfológicamente por meio da reação inflamatória [22]. A função imunológica é conceitualmente dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa [23], e a principal diferença entre estes dois tipos de respostas é que a resposta imune adaptativa é altamente específica para dado patógeno e torna-se mais eficiente após cada contato sucessivo com o mesmo agente infeccioso porque possui uma “memória” que evita que o patógeno possa posteriormente causar doenças [24].

A ativação da imunidade inata é imediata e por meio de estímulos específicos representados por estruturas moleculares que ocorrem unicamente em micro-organismos, estruturas essas que constituem os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), tais estruturas ativam a resposta imune por interagir com diferentes receptores chamados de receptores de reconhecimento de padrões (RRP), onde os RRP que mais se destacam são os receptores do tipo *Toll-like* (TLRs) [25], os quais estão envolvidos em opsonização, ativação do sistema complemento e fagocitose. Os TLRs estão presentes

principalmente em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, atualmente, 11 diferentes TLRs já foram identificados, localizados na membrana celular ou no interior das células [26].

Já a imunidade adaptativa é dependente de células especializadas como os linfócitos e as moléculas solúveis por eles produzidas para serem ativadas, além das células apresentadoras de antígenos (APCs) que apresenta antígenos associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) aos linfócitos. A especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo são as principais características da resposta adaptativa [27].

2.2 Inflamação

O termo inflamação vem do latim “*inflammare*” e do grego “*phlogos* (incendiar), e é um dos processos centrais necessário na defesa das células animais contra lesões ou infecções [28,29]. Quando o sistema imune reconhece o agente estimulador logo ocorre uma ativação e amplificação do mesmo ocasionando a ativação de células e a liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória. A vasodilatação local dos vasos sanguíneos, aumento da permeabilidade dos capilares locais, coagulação dos líquidos nos espaços intersticiais, migração de inúmeros granulócitos e monócitos para o tecido e edema das células caracterizam esse processo [30].

De modo histórico, as quatro manifestações clínicas da inflamação ou manifestações externas, hoje chamados também de sinais cardinais, são: rubor (vermelhidão), dor (dolor), calor (aquecimento) e tumor (inchaço), que foram observadas pelo médico romano Aulus Cronelius Celsus no primeiro século da era cristã; e a perda de função (*functio laesa*), a quinta manifestação clínica, foi introduzida pelo patologista alemão Rudolf Virchow dois séculos atrás [28]. Essas manifestações são consequência das alterações vasculares e do recrutamento e ativação dos leucócitos [31].

A inflamação ocorre em duas fases, sendo a primeira desencadeada logo após a infecção denominada de inflamação aguda, de curta duração, podendo variar de algumas horas até poucos dias entre o início, o desenvolvimento e o término. Na inflamação aguda predominam elementos da imunidade inata e é caracterizada por apresentar, predominantemente, neutrófilos no sítio da inflamação, aumento da permeabilidade vascular e eventos sistêmicos tais como aumento da temperatura, dor e elevação do conteúdo plasmático de várias proteínas [32] e geralmente resulta em cicatrização, onde os leucócitos infiltram-se na região danificada, removendo o estímulo e reparando o tecido [33].

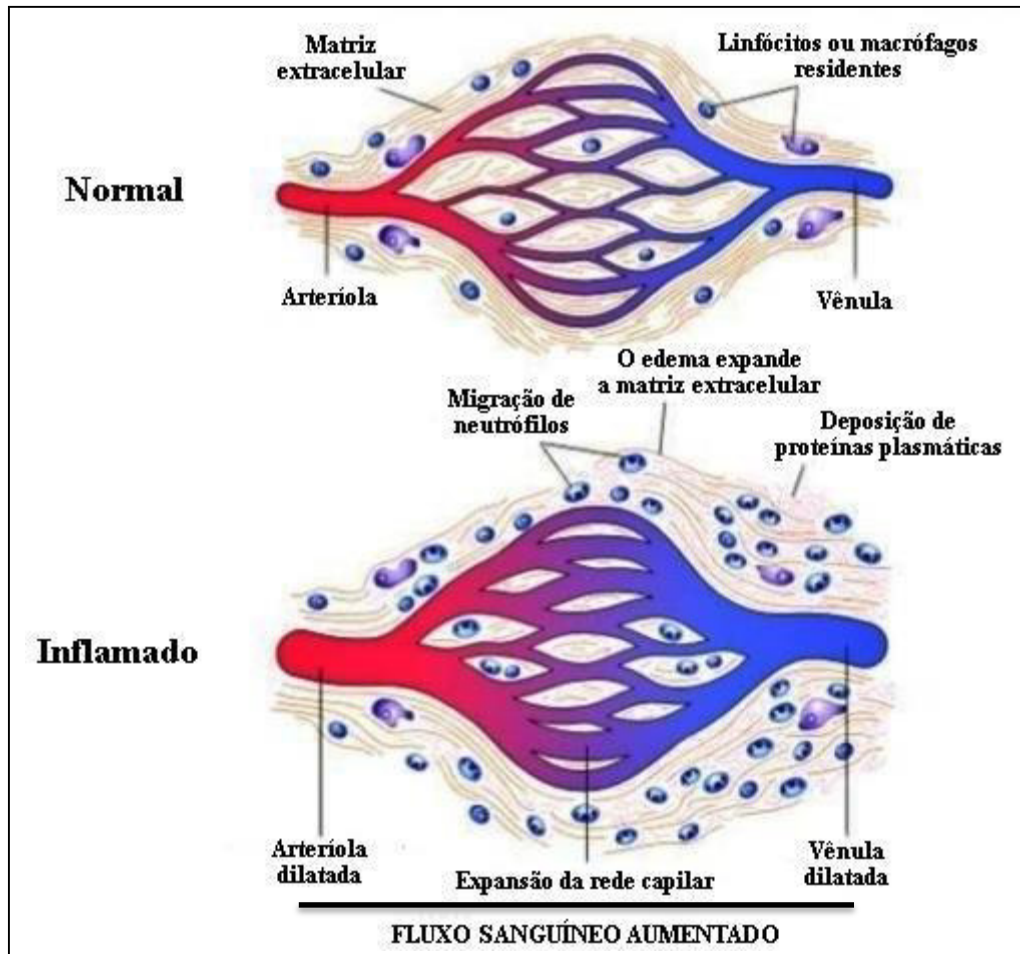
As reações inflamatórias agudas podem ser iniciadas por meio de vários estímulos, como: infecções, seja por bactérias, vírus ou fungos, que está entre as causas clínicas importantes mais comuns da inflamação; trauma por corte e penetração, ou por agentes químicos e físicos como lesão térmica por queimaduras ou frio profundo, irradiação, toxicidade de substâncias químicas ambientais, as quais lesam as células do hospedeiro e induzem as reações inflamatórias; necrose tecidual, incluindo isquemia como infarto do miocárdio e lesão química ou física; e reações imunológicas, também chamadas de reações de hipersensibilidade contra substâncias ambientais ou contra os próprios tecidos [31].

O segundo momento depende ou não da resolução do processo na fase aguda, inflamação crônica, caracterizado pela presença de células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), além de angiogênese e proliferação de tecido conjuntivo. A inflamação crônica é considerada um processo prolongado que pode ter semanas ou até anos de duração [32], e por este motivo é um fator de risco para vários cânceres humanos e outras doenças, visto que essa resposta persistente pode causar dano químico excedente às capacidades de reparo das células atingidas, o que leva a morte celular ou a modificações genéticas e epigenéticas que podem preparar as células para a transformação maligna [34].

Diversos estímulos persistentes podem induzir a cronificação do processo inflamatório, tais como infecções por microorganismos difíceis de erradicar como as micobactérias *Treponema pallidum*, que causa sífilis [31] e *Mycobacterium tuberculosis* [23]; doenças inflamatórias imunomediadas (distúrbios de hipersensibilidade); exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos (substâncias como a sílica que quando inalada pode induzir uma resposta inflamatória crônica nos pulmões, e agentes endógenos como os cristais de colesterol que podem contribuir para a aterosclerose) [31], certos vírus e fungos e agentes físicos, como a radiação ultra-violeta [23].

2.2.1 Eventos vasculares e celulares

As respostas imunes envolvidas na inflamação aguda são divididas em vasculares e celulares. A primeira diz respeito a alterações do calibre vascular que se iniciam rapidamente mas desenvolvem-se em velocidades variáveis (depende da natureza e gravidade do estímulo inflamatório) que resultam em aumento do fluxo sanguíneo (aumento da permeabilidade vascular) e alterações nas paredes vasculares (vasodilatação) que permitem que células sanguíneas e proteínas plasmáticas deixem a circulação e migrem para os locais da infecção ou lesão [31] conforme ilustrado na figura 1.



Fonte: Adaptada de Kumar, Abbas e Aster (2015)

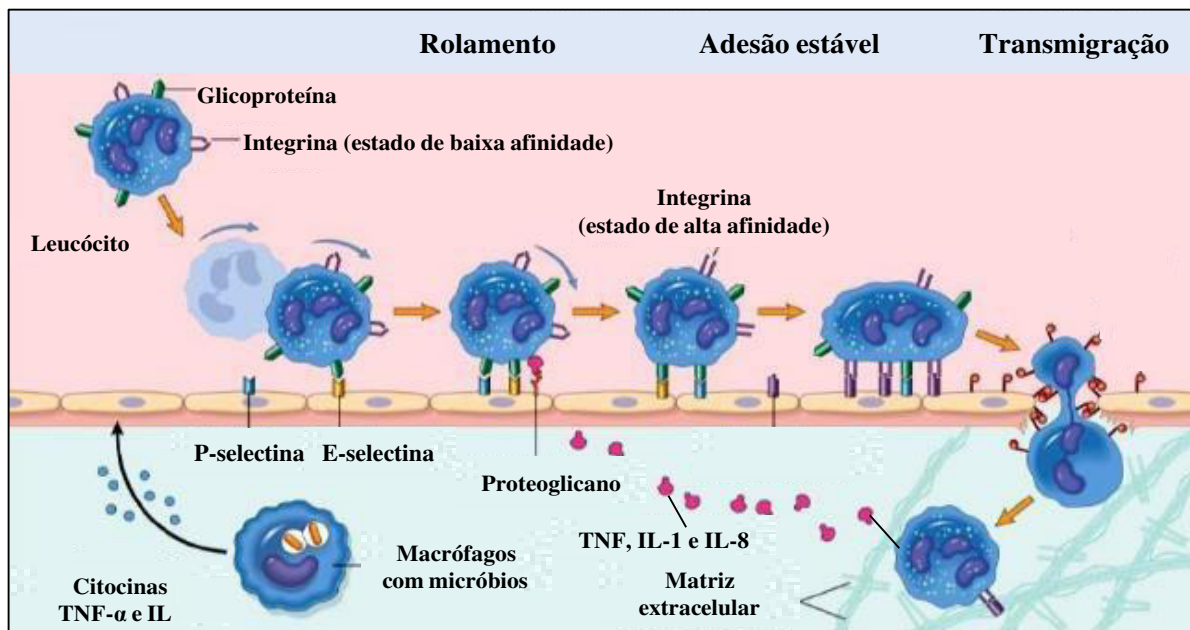
Figura 1. Reações celulares e vasculares da inflamação aguda.

No primeiro momento dos eventos vasculares, após a vasoconstrição transitória, as arteríolas dilatam-se e conseqüentemente ocorre aumento do fluxo sanguíneo e abertura dos leitos capilares, momento em que se pode observar a vermelhidão (*eritema*) e calor. Com o aumento da permeabilidade, o líquido rico em proteínas (exsudato) extravasa para dentro dos tecidos extravasculares, seu acúmulo causa *edema*, e as hemácias ficam mais concentradas aumentando a viscosidade do sangue e retardando a circulação (hemoconcentração), resultando, microscopicamente, em pequenos vasos dilatados, processo chamado de *estase*; provocando aumento da pressão osmótica do líquido intersticial o que causa maior efluxo de água do sangue para os tecidos [35].

Os vasos linfáticos também participam da resposta inflamatória, onde o fluxo da linfa aumenta, devido ao exsudato absorvido, e auxilia a drenar o fluido do edema dos espaços extracelulares e em casos mais severos a linfa pode até transportar o agente lesivo favorecendo sua disseminação. Neste processo, secundariamente, pode ocorrer a linfangite, que

é a inflamação dos vasos linfáticos, bem como a linfadenite, que é a inflamação dos linfonodos de drenagem, e neste processo pode-se observar o aumento dos linfonodos devido à hiperplasia dos folículos linfoides e ao aumento do número de linfócitos e células fagocíticas que revestem os seios dos linfonodos [31].

Várias são as células que participam das reações inflamatórias, algumas dessas células já se encontram no tecido lesado, como as células endoteliais vasculares, mastócitos, macrófagos e células mononucleares residentes, mas os leucócitos são advindos do sangue e uma importante função da resposta inflamatória é transportá-los ao local e ativá-los [36]. A figura 2 mostra o processo de migração dos leucócitos e as principais citocinas envolvidas.



Fonte: Adaptada de Kumar, Abbas e Aster (2015)

Figura 2. Mecanismos de migração dos leucócitos através dos vasos sanguíneos e o papel das citocinas na inflamação aguda.

Normalmente no sangue os leucócitos fluem rapidamente, ao ocorrer uma lesão/infeção eles têm de ser parados e levados ao estímulo ou local da lesão, os chamados sítios tipicamente extracelulares. Com a *estase* desenvolvida, ocorre a *marginção*, que é o acúmulo de leucócitos (especialmente os neutrófilos) ao longo da superfície endotelial e subsequentemente *rolam* na superfície endotelial aderindo de forma transitória nas moléculas de adesão da família das selectinas [31], que são receptores expressos nos leucócitos e no endotélio que contêm um domínio extracelular que se liga à açcares cujo os três membros dessa família são E-selectina, a P-selectina e a L-selectina [24]. Os leucócitos em rolagem são

capazes de sentir mudanças no endotélio e se aderem a elas, *adesões* essas mediadas por integrinas expressas nas superfícies celulares dos leucócitos [31].

As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas transmembrana expressas, normalmente, nas membranas plasmáticas dos leucócitos em estado de baixa afinidade e que só aderem aos seus ligantes quando ocorre a ativação dos leucócitos pelas quimiocinas [24]. Por meio das quimiocinas e outras citocinas como o TNF e IL-1 a ligação de integrinas com ligantes do endotélio se torna mais forte e regulam modificações no citoesqueleto o que torna a adesão dos leucócitos mais estáveis nos locais de inflamação [31].

Depois da aderência, os leucócitos migram pela parede do vaso expremendo-se entre as células ao nível das junções intercelulares, esse movimento é chamado de *diapedese*, ocorre principalmente nas vênulas da circulação sistêmica e também nos capilares da circulação pulmonar, migram em direção ao local da lesão ou infecção, por meio da quimiotaxia, ou seja, por meio de substâncias químicas exógenas e endógenas que atuam como fatores quimiotáticos, como os produtos bacterianos, as quimiocinas, componentes do sistema complemento, produtos da via da lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico (AA), os quais serão comentados mais adiante [31].

Na grande parte das inflamações agudas, os leucócitos predominantes são os neutrófilos (nas primeiras 6-24 horas), mas estes possuem vida curta e morrem por apoptose, e são substituídos pelos monócitos (24-48 horas) que sobrevivem mais tempo, portanto há excessões dependendo do tipo de infecção. Depois de ativados os leucócitos podem fagocitar partículas, fagocitar e destruir micróbios e células mortas, liberar substâncias que destroem micróbios extracelulares e células mortas e também produzir mediadores que amplifiquem a reação inflamatória [31].

2.2.2 Mediadores inflamatórios

Os mediadores inflamatórios são moléculas responsáveis pelos eventos vasculares e celulares da inflamação, os quais são liberadas por indução da ligação entre alarminas (PAMP- moléculas-padrão associadas a patógenos ou DAMP - moléculas-padrão associadas a dano tecidual) e receptores celulares [37], são moduladores dos principais eventos relacionados a inflamação como vasodilatação, opsonização, quimiotaxia, destruição tecidual, dor, febre e mal estar [35] alguns são estimuladores (pró-inflamatórios) e outros inibidores (anti-inflamatórias) do processo inflamatório [37].

Os mediadores podem ser produzidos pelas células no local da inflamação ou sintetizados no fígado e circular no plasma como precursores inativos que são ativados no local da

inflamação. As reações inflamatórias cedem porque muitos mediadores, após serem ativados e liberados das células, se decompõem rapidamente ou são inativados por enzimas, removidos ou ainda inibidos completamente por proteínas inibidoras do sistema complemento [38]. Os principais mediadores inflamatórios são descritos a seguir.

Aminas vasoativas, histamina e serotonina são as principais aminas com papel na reação inflamatória a primeira é liberada dos grânulos dos mastócitos em respostas a estímulos como lesão física, ligação de anticorpos IgE aos receptores Fc dos mastócitos, neuropeptídeos (p.ex., substância P) e certas citocinas (p. Ex., IL-1 e IL-8). É responsável pela dilatação das arteríolas, em humanos, e o principal mediador inicial do aumento da permeabilidade vascular. A segunda é responsável pela vasoconstrição durante a coagulação, encontrado primariamente nos granulos das plaquetas [37].

Citocinas, polipeptídios produzidos por muitos tipos celulares (macrófagos, mastócitos, células endoteliais), regulam a resposta imunitária inata e adaptativa. Algumas favorecem a inflamação, ou seja, são *citocinas pró-inflamatórias*, como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (mais comuns na resposta inata), e IL-17, IL-18 e IFN- γ (mais envolvidas na resposta adaptativa); e outras diminuem, *citocinas anti-inflamatórias*, como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β . O TNF- α e IL-1 têm como principal papel a ativação endotelial no processo inflamatório, pois estimulam a expressão de moléculas de adesão endotelial, que resulta em aumento do recrutamento, aderência dos leucócitos e aumento da produção de citocinas e eicosanoides [24].

As quimiocinas são peptídios que atuam primariamente como quimioatraentes para diferentes grupos de linfócitos. Elas podem induzir o processo inflamatório (*quimiocinas induzíveis*), secretadas após as agressões, responsáveis pelo tráfego, ativação e diferenciação de células leucocitárias, ou *quimiocinas homeostáticas*, produzidas constitutivamente, responsáveis pela migração de células nos tecidos imunitários, como linfonodos e baço. São divididas de acordo com os resíduos de cisteínas em dois grupos: *Quimiocinas CXC*, como IL-8, em respostas a produtos microbianos e outras citocinas como IL-1 e TNF; e *Quimiocinas CC*, como a MCP (proteína 1 quimioatraente de monócitos) e a MIP-1 α (proteína inflamatória de macrófagos 1 α), ambas quimiotáticas para monócitos, a RANTES (regulated on activation normal T expressed and secreted), quimiotática para células T CD4+ de memória e monócitos, e a eotaxina, quimiotática para eosinófilos [24].

Metabólitos do AA, prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas podem mediar praticamente cada etapa da inflamação, atuam localmente onde são formados. Em geral, as prostaglandinas atuam como agente de agregação plaquetária e vasoconstritor (tromboxano – TXA₂), vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária (prostaglandinas I₂ – PGI₂), vasodilatação e

potencialização da formação de edema (prostaglandinas E_2 , D_2 e $F_{2\alpha}$ – PGE_2 , PGD_2 e $PGF_{2\alpha}$) e estão envolvidas na dor e febre inflamatória. Os leucotrienos podem ser agentes quimiotáticos para neutrófilos (LTB_4) e causadores de vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular (LTC_4 , LTD_4 e LTE_4). E as lipoxinas são mediadores anti-inflamatórios que inibem a quimiotaxia e a aderência dos neutrófilos ao endotélio [38].

Os AA têm papel central na utilidade clínica de drogas anti-inflamatórias que bloqueiam sua síntese, a maioria dos AINEs como a aspirina, ibuprofeno, indometacina que inibem a ciclooxigenase (COX), especificamente a COX-2 (a qual é induzida por agentes inflamatórios em tecidos não normais), e portanto a produção de prostaglandinas ajudam no tratamento da dor e da febre [38].

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas por uma família de enzimas conhecidas como NOX (NADPH oxidase), a regulação inadequada dessas enzimas contribuem para condições inflamatórias, onde estimulam o dano oxidativo inespecífico de células. As EROs são liberadas dos neutrófilos e macrófagos ativados por bactérias, imunocomplexos, citocinas e uma variedade de estímulos inflamatórios. Em níveis baixos, as EROs podem aumentar a expressão das moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas, amplificando a cascata de mediadores inflamatórios [39].

O óxido nítrico (NO) é um gás radical livre altamente reativo, crítico para o funcionamento normal das células e um mediador importante na regulação da vasodilatação, é usado pelos macrófagos ativados como metabólico citotóxico para destruir micróbios e células tumorais, é sintetizado pelas enzimas da família óxido nítrico sintases (NOS), e sob condições inflamatórias é especificamente sintetizado pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS) induzido por várias citocinas e mediadores inflamatórios, principalmente por IL-1, TNF, IFN- γ e endotoxinas bacterianas [39].

O sistema complemento que diferente dos mediadores descritos anteriormente (derivados de células) é derivado de proteínas plasmáticas, e consistem em proteínas com papéis fundamentais na defesa do hospedeiro e na inflamação. Oponizam partículas para fagocitose e destruição, e contribuem para a resposta inflamatória, aumentando a permeabilidade vascular, a quimiotaxia dos leucócitos e ativação dos mastócitos [24].

2.3 Aspectos históricos das lectinas

No final do século XIX, evidências apontavam a existência de proteínas com a capacidade de aglutinar eritrócitos, essas proteínas eram chamadas de hemaglutininas ou fitohemaglutininas pois eram encontradas, em sua maioria, em plantas [10].

O primeiro documento sobre o que hoje conhecemos como lectinas data de 1860, Silas Weir Mitchell observou que uma gota do veneno da serpente *Crotalus durissus* e uma gota de sangue da asa ferida de um pombo coagularam rapidamente em menos de três minutos [40]. A primeira descrição de lectinas vegetais ocorreu em 1888 na qual Peter Herrman Stillmark isolou uma substância tóxica das sementes de mamonas (*Ricinus communis*) a qual ele denominou como ricina na sua dissertação intitulada “*Über Ricin ein giftiger Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiaceen*” (Sobre a ricina: Um fermento tóxico de sementes de *Ricinus communis* L. e algumas outras espécies de Euforbiáceas) [41]. Dez anos depois Elfstrand introduziu pela primeira vez o termo “hemaglutinina”, termo esse que definia todas as proteínas vegetais capazes de aglutinar células [16].

Em 1907 a concepção de que todas as hemaglutininas eram tóxicas foi abandonada depois do trabalho de Ladsteiner e Raubitscheck descreverem pela primeira vez uma lectina não tóxica das sementes de leguminosas de *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinares* (lentilha) e *Vicia sativa* (ervilhaca-comum). A partir de então, ficou definido que a toxicidade remetida às lectinas é exceção e não regra [16]. A primeira lectina pura foi isolada a partir das sementes de *Canavalia ensiformes* por James Sumner a qual ele nomeou de concanavalina A (ConA) [10].

Um grande marco na história das lectinas ocorreu em 1948 por Renkonen e Boyd e Regueira em 1949. Essa descoberta relatou que algumas hemaglutininas apresentam uma clara preferência a um tipo de eritrócito específico dentro do sistema sanguíneo ABO [16] e em 1952 foi constatado que os atributos hemaglutinantes dessas hemaglutininas eram baseadas em uma atividade específica de ligação a carboidratos [42]. Devido a essa peculiar habilidade em distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos, Boyd e Shapleigh, em 1954, propuseram o termo “lectina” (do latim *legere*, que significa selecionar ou escolher) para nomear essas proteínas [10].

Outro grande marco histórico das lectinas foi demonstrado por Petter C. Nowell, em 1960, o qual demonstrou que as lectinas das sementes de *Phaseolus vulgaris* (PHA) possui atividade mitogênica sobre linfócitos. Essa descoberta revolucionou a área da imunologia, pois até aquele momento acreditava-se que os linfócitos eram células incapazes de dividirem-se ou diferenciar-se em outros tipos celulares [10].

2.4 Lectinas de leguminosas

As lectinas são amplamente distribuídas no reino vegetal, mas dentre as de plantas, as mais estudadas pertencem a família Fabaceae e, particularmente as da subfamília Papilionoideae [19]. A abrangência ecológica da família permite a ocupação dos mais diversos habitats, é uma característica peculiar e de relevante significado para a sua grande riqueza nas formações vegetacionais neotropicais [43]. Ecologicamente, o sucesso das leguminosas tem sido atribuído aos seus métodos de defesa (acúleos e metabólitos secundários), a eficiência na reprodução e principalmente a capacidade de adquirir substâncias essenciais para o crescimento [44].

As lectinas de leguminosas são as mais conhecidas e caracterizadas por serem muito abundante nas sementes, além do processo de obtenção da maioria depender de um ou dois passos de purificação [16]. O interesse a esse grupo de lectinas se deve, principalmente, pelo uso delas na detecção, isolamento e caracterização de oligossacarídeos, na tipagem sanguínea e identificação de glicoconjugados, como glicoproteínas [45]. Há décadas se conhece propostas de funções destas proteínas para as plantas, tais como proteção contra patógenos e insetos; transporte e armazenamento de carboidratos; reconhecimento celular, seja dentro da célula, entre células ou entre organismos; proteínas de reserva ou reguladoras de crescimento [46].

Adicionalmente, algumas lectinas de leguminosas se tornaram ferramentas indispensáveis na pesquisa biológica e biomédica além de serem amplamente utilizadas como proteínas bioativas tanto na pesquisa quanto na medicina [16].

As lectinas de leguminosas possuem entre 25 e 30 kDa e geralmente se associam como dímeros ou tetrâmeros. Estas proteínas apresentam uma grande conservação de sua estrutura monomérica, indicando extensiva similaridade sequencial, ao mesmo tempo em que exibem uma notável variedade de associações quaternárias com importantes implicações funcionais [47]. As pequenas variações sequenciais e de arranjo quaternário parecem significar diferenças importantes em testes de atividades biológicas com lectinas de leguminosas *in vitro* e *in vivo* [19].

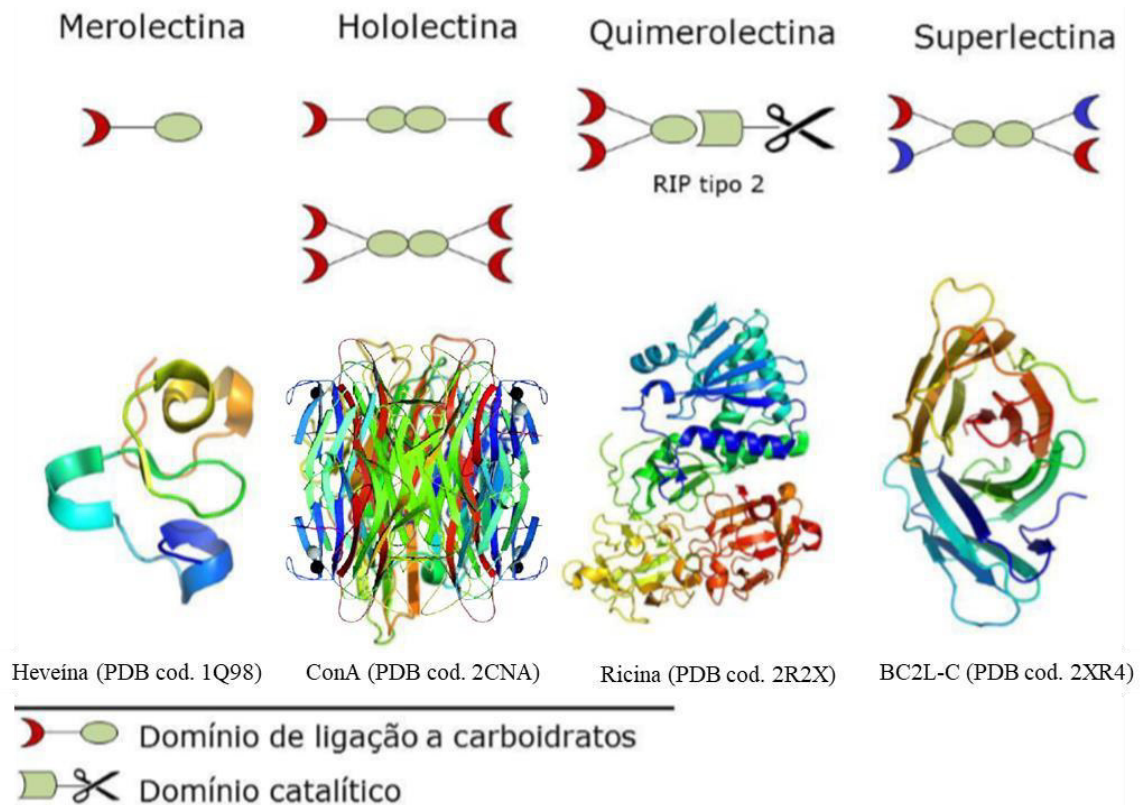
2.5 Aspectos estruturais das lectinas

As lectinas apresentam uma grande diversidade estrutural e o aspecto comum entre estas moléculas é a presença de pelo menos um sítio de ligação a carboidrato em cada cadeia polipeptídica [11]. O sítio primário de ligação a carboidratos das lectinas de leguminosas consiste em uma região na superfície da molécula composta por quatro voltas que

proporcionam a formação de uma cavidade na superfície da mesma, onde o reconhecimento específico de carboidratos se dá por intermédio de ligações de hidrogênio entre a lectina e o açúcar. Também participam do processo de reconhecimento interações de Van der Waals estabelecidas entre o anel aromático do aminoácido do açúcar e as cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos: a estabilização dos monossacarídeos ocorre também através de interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácido [48].

Além de um sítio de ligação a carboidratos, altamente conservado, juntamente com um sítio de ligação a metais, que é responsável pela estabilização da volta que compõe o sítio de ligação a carboidratos, estudos mostraram a capacidade dessas proteínas interagirem com compostos hidrofóbicos. Algumas lectinas de leguminosas podem interagir com outras espécies de moléculas, que não são carboidratos, tais como adenina e ácido aminobutírico (Abu) [49]. A ligação das lectinas a essas moléculas se dá através de uma região estrutural hidrofóbica, altamente conservada em muitas lectinas de leguminosas e que, devido a esse alto grau de conservação, pode estar envolvida em algum papel biológico importante [48].

As lectinas de leguminosas são comumente classificadas em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 3) [13].



Fonte: Adaptada de Peumans e Van Damme (1998).

Figura 3. Grupos de lectinas vegetais de acordo com os domínios de reconhecimento a carboidratos

As merolectinas são um grupo de proteínas que por serem de natureza monovalente, são incapazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados, como exemplo pode ser citado a heveína, extraída do látex da seringueira *Hevea brasiliensis*, que se liga a quitina. As hololectinas são proteínas com dois ou mais sítios de ligação para carboidratos, idênticos ou homólogos, devido a sua natureza di ou multivalente aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados, neste grupo está a maioria das lectinas de plantas, como exemplo temos a ConA. As quimerolectinas possuem ao menos dois domínios com atividades distintas: um capaz de se ligar a carboidratos ou glicoconjugados e outro domínio distinto e bem definido, capaz de exercer uma atividade enzimática ou outra atividade biológica qualquer. A ricina de *Ricinus communis* L. exemplifica este grupo. Já as superlectinas são aquelas lectinas que se ligam pelo menos a dois tipos de carboidratos estruturalmente e funcionalmente diferentes [50]. Elas desempenham um papel central em uma variedade de eventos biológicos, como reconhecimento de moléculas em células e interações célula-célula, como exemplo, a lectina do bulbo de tulipa que possui domínios ligantes a Manose e a GalNac não relacionados [10].

2.6 Atividades biológicas de lectinas

Publicações relatam diversos papéis biológicos de origem farmacológica, imunológica, toxicológica exibidos por lectinas em sistemas celulares ou em estudos *in vivo*. As lectinas mais bem caracterizadas são as extraídas de plantas da família Fabaceae, as quais pertencem a um grupo altamente homólogo, mas com especificidades e estruturas quaternárias amplamente variáveis, o que influencia muito nos seus papéis biológicos reconhecidos [51]. Como um exemplo dessa diversidade têm-se a tabela 1 a seguir.

Tabela 1. Estudos de atividades biológicas de lectinas

Estudos	Lectina	Referências
Antifúngica	MaL (<i>Machaerium acutifolium</i>)	[21] Dias et al., 2020
Antinociceptiva	PPL (<i>Parkia platycephala</i>)	[52] Leite et al., 2020
	MaL	[20] Santos et al., 2019
Moduladora sobre resistência microbiana	VML (<i>Vatairea macrocarpa</i>)	[53] Santos et al., 2019 ^a
	DVL (<i>Dioclea violacea</i>)	[54] Santos et al., 2019 ^b
Anti-helmíntica	PPL	[55] Silva et al., 2019
	ConBr (<i>Canavalia brasiliensis</i>)	[56] Batista et al., 2018
Inseticida	ConA (<i>Canavalia ensiformis</i>)	[57] Reyes-Montaña;

		Vega-Castro, 2018
Antitumorais	Eutirucalina (<i>Euphorbia tirucalli</i>)	[58] Palharini et al., 2017
Vasorelaxantes	CNA (<i>Clathrotropis nitida</i>)	[59] Alves et al., 2015
Antiviral	UDA (<i>Urtica dioica</i>)	[60] Kumaki et al., 2011

Elaborada pela autora

2.6.1 Lectinas e atividade inflamatória

Muitas lectinas de leguminosas tem demonstrado efeito em processos pró ou anti-inflamatórios, dependendo da via de administração usada no ensaio. De acordo com Cavada e colaboradores [61]), quando a via de administração é local, as lectinas provocam edema de pata e migração de neutrófilos. Por outro lado, quando administrados sistemicamente, exibem atividade anti-inflamatória com aumento da permeabilidade celular, estimulando a migração de neutrófilos. Na tabela a seguir (Tabela 2) listou-se lectinas de origem vegetal que desempenham atividades anti-inflamatórias e/ou pró-inflamatórias.

Tabela 2. Lectinas no processo inflamatório.

Lectina	Efeito	Mecanismo	Carboidrato ligante	Referências
MaL	Anti-inflamatória	Modulação de iNOS e genes de citocinas	Manose/ α -metil- <i>D</i> -manosídeo	[62] Santos et al., 2020
CaBo (<i>Canavalia bonariensis</i>)	Pró-inflamatória	Liberação de histamina Interação com os receptores da célula N-glicosilados	Glicose/manose	[63] Cavada et al., 2020
DVL	Anti-inflamatória	Expressão negativa do ICAM-1	α -metil- <i>D</i> -manosídeo	[64] Clemente-Napimoga et al., 2019
Cvill (<i>Canavalia villosa</i>)	Pró-inflamatória	Não determinado	Glicose/manose	[65] Lossio et al., 2017
LAL (<i>Lonchocarpus araripensis</i>)	Anti-inflamatória	Inibição de 5-HT, BK, de PGE ₂ , NO, TNF- α e leucócitos	<i>N</i> -acetilglicosamina	[66] Pires et al., 2016
PPL	Anti-inflamatória	Modulação de mediadores inflamatórios Inibição da migração de leucócitos	Glicose/manose	[67] Bari et al., 2016
DrfL (<i>Dioclea reflexa</i>)	Pró-inflamatória	Não determinado	<i>D</i> -manose/ α -metil- <i>D</i> -manosídeo	[68] Pinto-Junior et al., 2015
CoxyL (<i>Canavalia oxyphylla</i>)	Pró-inflamatória	Não determinado	<i>D</i> -glicose/ <i>D</i> -manose, / α -metil- <i>D</i> -manosídeo	[69] Santiago et al., 2014

FRIL (<i>Dolichos lablab</i>)	Pró-inflamatória	Não determinado	Manose/glicose	[70] Teixeira et al., 2014
CboL (<i>Canavalia boliviana</i>)	Anti-inflamatória	Migração de neutrófilos	<i>D</i> -mannose/ <i>D</i> -glucose	[71] Bezerra et al., 2014
PBL (<i>Parkia biglobosa</i>)	Anti-inflamatória	Modulação de mediadores inflamatórios Inibição da migração de leucócitos	Manose/glicose	[72] Silva et al., 2013
AFAL (<i>Acacia farnesiana</i>)	Anti-inflamatória	Redução de IL-8	Não determinado	[73] Abrantes et al., 2013
LAL (<i>Luetzelburgia auriculata</i>)	Anti-inflamatória	Modulação de PGE2	<i>N</i> -acetil- <i>D</i> -galactosamina	[74] Alencar et al., 2010
DwL (<i>Dioclea wilsonii</i>)	Pró-inflamatória	Modulação positiva da desgranulação dos mastócitos	Glicose/manose	[75] Rangel et al., 2011
CFL (<i>Cratylia floribunda</i>)	Anti-inflamatória	Migração de neutrófilos	Glicose/manose	[76] Assreuy et al., 1997
DguiL (<i>Dioclea guianensis</i>)	Anti-inflamatória	Migração de neutrófilos	Manose/glicose	[76] Assreuy et al., 1997

2.7 A lectina de *Machaerium acutifolium*

A espécie *Machaerium acutifolium* é conhecida popularmente como jacarandá, pertence a família das leguminosas (Fabaceae), da subfamília Papilionoideae, da tribo Dalbergieae [77]. *Machaerium* é um dos maiores gêneros arbóreos tropicais de Papilionoideae com aproximadamente 130 táxons e ocorre na maioria das formações vegetais e regiões florísticas do mundo [78] e podem ser utilizadas na recomposição de áreas degradadas [79].



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 4. *Machaerium acutifolium* (A) Folha com folículos (B) Inflorescência pêndula (C) Semente tipo sâmara alada (D) Flor.

A MaL é uma glicoproteína com atividade hemaglutinante até 50 °C e consideravelmente reduzida após incubação a 60 °C, atua em uma faixa de pH 6,0 e 7,0, composta por uma cadeia principal de 29 kDa (cadeia α) e duas cadeias menores de 13 kDa (cadeia β) e 8 kDa (cadeia γ). A atividade hemaglutinante da MaL é inibida pelos carboidratos manose, α -metil-D-manopiranosídeo e N-acetil-D-glicosamina e sua estrutura secundária teórica é composta de 3% de α -hélice, 44% de folha- β , 21% de volta β e 32% de estrutura randômica [20].

A MaL foi capaz de reduzir a nocicepção orofacial induzida pela capsaicina via receptor TRPV1 (Receptor vanilóide de potencial transitório) em ensaios com zebra-fish [20], exercer efeitos antifúngicos contra *Candida parapsilosis* por alterar a estrutura da membrana e induzir apoptose via produção de espécies reativas de oxigênio [21] e apresentou atividade anti-inflamatória por meio de modulação de citocinas [62].

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito anti-inflamatório da lectina obtida das sementes de *Machaerium acutifolium* em modelos de camundongos com inflamação aguda e crônica e modelos de macrófagos estimulados por LPS.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a atividade anti-inflamatória da MaL em modelos agudos de nocicepção central e periférica e modelo crônico de granuloma;
- Avaliar a atividade anti-edematogênica da MaL;
- Analisar o efeito da MaL no extravasamento de proteínas e migração de leucócitos por peritonite;
- Verificar a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 tratados com MaL;
- Quantificar a modulação da expressão gênica estimulada por LPS e MaL.

REFERÊNCIAS

- [1] J.C.C. Carraro, H.H.M. Hermsdorff, B.Puchau, M.A. Zulet, F.I. Milagro, J. Bressan, J. A. Martínez, Interleukin-6 is a better metabolic biomarker than interleukin-18 in young healthy adults, *Journal of Physiology and Biochemistry* 71 (2015) 527–535.
- [2] S.L. Robbins, R.S. Cotran, V. Kumar, *Pathologic basic of diseases*, Philadelphia: W. B. Saunders, 1994.
- [3] A.C. Guyton, J.E. Hall, *Tratado de Fisiologia Médica*, Editora Guanabara Koogan, 2002.
- [4] S. Phalitakul, M. Okada, Y. Hara, H. Yamawaki, Vaspin prevents TNF- α -induced intracellular adhesion molecule-1 via inhibiting reactive oxygen species-dependent NF- κ B and PKC θ activation in cultured rat vascular smooth muscle cells, *Pharmacological Research* 64 (2011) 493-500.
- [5] C. Roubile, J. Martel-Pelletier, J. Davy, B. Haraoui, J. Pelletier, Cardiovascular Adverse Effects of Anti-Inflammatory Drugs, *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 12 (2013) 55-67.
- [6] C.R. Craig, R.E. Stitzel, *Modern Pharmacology with Clinical Applications*, Philadelphia, PA (2004).
- [7] S. Bacchi, P. Palumbo, A. Sponta, M.F. Coppolino, Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Review, *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 11 (2012) 52-64.
- [8] K. Izuhara, S.T. Holgate, M. Wills-Karp, *Inflammation and Allergy Drug Design*, John Wiley & Sons, Chichester, 2011.
- [9] S.C. Ko, Y.J. Jeon, Anti-inflammatory effect of enzymatic hydrolysates from *Styela clava* flesh tissue in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 macrophages and *in vivo* zebrafish model, *Nutrition Research and Practice* 9 (2015) 219-26.
- [10] N. Sharon, H. Lis, History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules, *Glycobiology* 14 (2004) 53-64.
- [11] N.C.A. Ximenes, Caracterização e avaliação de atividades biológicas da lectina da vagem *Caesalpinia ferrea* (CfePL). Tese (Doutoramento em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, 2009.
- [12] B. Mukhopadhyay, M.B Matins, R. Karamanska, D.A. Russell, R.A. Field, Bacterial detection using carbohydrate-functionalised CdS quantum dots: a model study exploiting *E. coli* recognition of mannosides, *Tetrahedron Lett* 50 (2009) 886-9.

- [13] W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme, Plant Lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 15 (1998) 199-227.
- [14] S. Ratanapo, W. Ngamjunyaporn, M. Chulavatnatol, Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*, *Plant Science* 160 (2001) 739–744.
- [15] R. Sampietro, M.A. Isla, E.N. Quiroga, M.A. Vattuone, Na N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt, *Fruits, Plant Science* 160 (2001) 659-67.
- [16] E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans, A. Barre, P. Rougé, Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles, *Critical reviews in plant Sciences, Toulouse Cedex*, 17 (1998) 575–692.
- [17] K.N. Suseelan, R. Mitra, R. Pandey, K.B. Sainis, T.G. Krishna, Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 407 (2002) 241-247.
- [18] B.S. Cavada, M.V. Ramos, E.F. Cordeiro, T.B. Grangeiro, J. Oliveira, A.F.U. Carvalho, R.A. Moreira, Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 8 (1996) 37-42.
- [19] B.S. Cavada, T. Barbosa, S. Arruda, T. B. Grangeiro, M. Barral Netto, Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in Biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins, *Current Protein & Peptide Science* 2 (2001) 123-135.
- [20] A.L.E. Santos, G.O. Leite, R.F. Carneiro, R.R. Roma, V.F. Santos, M.H.C. Santos, R.O. Pereira, R.C. Silva, C.S. Nagano, A.H. Sampaio, B.A.M. Rocha, P. Delatorre, A.R. Campos, C.S. Teixeira, Purification and biophysical characterization of a mannose/N-acetyl-D-glucosamine-specific lectin from *Machaerium acutifolium* and its effect on inhibition of orofacial pain via TRPV1 receptor, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 664 (2019) 149-156.
- [21] L.P. Dias, A.L. Santos, N.M.S. Araújo, R.R.S. Silva, M.H.C. Santos, R.R. Roma, B.A.M. Rocha, J.T.A. Oliveira, C.S. Teixeira, *Machaerium acutifolium* lectin alters membrane structure and induces ROS production in *Candida parapsilosis*, *International Journal of Biological Macromolecules* 163 (2020) 19-25.

- [22] G.B. Filho, Bogliolo Patologia, nine ed. A Guanabara Koogan LTDA, Rio de Janeiro, 2016.
- [23] W.M. Cruvinel, D.Júnior, J.A.P. Araújo, T.T.T. Catelan, A.W.S. Souza, N.P. Silva, L.E.C. Andrade, Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response, Bras. J. Rheumatol. 50 (2010) 434-61.
- [24] I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, Imunologia, six ed. Manole LTDA, São Paulo, 2003.
- [25] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C.A Janeway Jr, A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity, Nature 388 (1997) 394-397.
- [26] C.A. Janeway, R. Medzhitov, Innate immunity recognition, Annu Rev Immunol 20 (2002) 197-216.
- [27] P.J. Delves, I.M. Roitt, The Immune System – First of two parts, The New England Journal of Medicine 343 (2000) 37-50.
- [28] R. Fabiola, Inflammation, Our Constant Companion, Cell 140 (2010) 755-757.
- [29] N. Isailovic, K. Daigo, A. Mantovani, C. Selmi, Interleucina-17 e imunidade inata em infecções e inflamação crônica, J. Autoimmun. 60 (2015) 1-11.
- [30] C. Nathan, Points of control in inflammation, Nature 420 (2002) 846-852.
- [31] A.K. Abbas, V. Kumar, J.C. Aster, Robbins Patologia Básica, nine ed. Elsevier Editora LTDA, Rio de Janeiro, 2013.
- [32] H. Bauhmann, J. Gaudie, The acute phase response, Immunology Today 15 (1994) 74-80.
- [33] M. Samia, B. Claudia, Inflammation, Nature 454 (2008) 427.
- [34] C. Bogdan, Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update, Trends in Immunology 36 (2015) 161-178.
- [35] M.R.L. Mota, Estudo da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da lectina isolada de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (Poir.) Kunth. Tese (Doutoramento em Farmacologia) Universidade Federal do Ceará, 2008.
- [36] E.S.O. Vanderlei, Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh var. *lycopodium* em animais, Dissertação (Mestrado em bioquímica) – Universidade Federal do Maranhão, 2008.
- [37] G.B. Filho, Bogliolo, patologia/Geraldo Brasileiro Filho, nine ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2016.
- [38] V. Kumar, A.K. Abbas, J.C. Aster, Robbins Patologia Básica, nine ed. Elsevier Editora LTDA, Rio de Janeiro, 2013.

- [39] M. Lind, A. Hayes, M. Caprnda, D. Petrovic, L. Rodrigo, P. Kruzliak, A. Zulli, Inducible nitric oxide synthase: Good or bad?, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 93 (2017) 370-375.
- [40] S.W. Mitchell, Researches upon the venom of the rattlesnake, *Smithson Contrib Knowl* 22 (1860) 89-90.
- [41] H. Stillmark, Uber Ricin, ein giftiges Ferment uas den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Tese de doutorado, Universidade de Dorpat, Estônia, 1888.
- [42] W.M. Watkins, W.T.J. Morgan, Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars, *Nature* 169 (1952) 825-826.
- [43] H.C. Lima, Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.
- [44] R.M. Polhill, P.H. Raven, *Advances in legume systematics*, Kew: Royal Botanic Gardens, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (Great Britain), 1981.
- [45] R.G. Benevides, Caracterização bioquímica e estrutural de uma lectina recombinante de sementes de *Platypodium elegans* Vogel. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, 2011.
- [46] Pusztai, *Plant Lectins*. Cambridge University Press (1991) 290.
- [47] V.R. Srinivas, G.B. Reddy, N. Ahmad, C.P. Swaminathan, N. Mitra, A. Surolia, Legume lectin family, the ‘natural mutants of the quaternary state’, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization, *Biochim. Biophys. Acta* 1527 (2001) 102–111.
- [48] F.B.M.B. Moreno, T.M. Oliveira, D.E. Martil, M.M. Vicoti, G.A. Bezerra, J.R.B. Abrego, B.S. Cavada, W.F. Azevedo, Identification of a new quaternary association for legume lectins, *Journal of Structural Biology* 161 (2008) 133-143.
- [49] R.T.W. Hamelryck, J. Loris, M. Bouckaert, C. Dao-Thi, A. Strecher, E. Imberty, L. Fernandez, M.E. Wyns, *Journal of Molecular Biology* 286 (1999) 1161-1177.
- [50] W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme, Lectins as plant defense proteins, *Plant Physiology* 109 (1995) 347-352.
- [51] A.M. Lagarda-Diaz, L. Guzman-Partida, Vazquez-Moreno, Lectinas de leguminosas: proteínas com diversas aplicações, *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2017) 1242.

- [52] G.O. Leite, S.A.A.R. Santos, F.M.D.H. Bezerra, F.E.S. Silva, A.D.C. Ribeiro, R.R. Rodrigues, R.R.S. Silva, M.H.C. Santos, A.L.E. Santos, C.S. Teixeira, A. R. Campos, Is the orofacial antinociceptive effect of lectins intrinsically related to their specificity to monosaccharides?, *International Journal of Biological Macromolecules* 161 (2020) 1079-1085.
- [53] ^aV.F Santos, M.S. Costa, F.F. Campina, R.R. Rodrigues, A.L.E. Santos, F.M. Pereira, K.L.R. Batista, R.C. Silva, R.O. Pereira, B.A.M. Rocha, H.D.M. Coutinho, C.S Teixeira, The Galactose-Binding Lectin Isolated from *Vatairea macrocarpa* Seeds Enhances the Effect of Antibiotics Against *Staphylococcus aureus*-Resistant Strain. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 19 (2019) 1-9.
- [54] ^bV.F. Santos, A.C.J. Araújo, A.L.F. Silva, D.V. Almeida, P.R. Freitas, A.L.E. Santos, B.A.M. Rocha, W. Garcia, A.M. Leme, E. Bondan, F.T. Borges, B.S. Cutrim, L.C.N. Silva, H.D.M. Coutinho, C.S. Teixeira, Dioclea violacea lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure, *International Journal of Biological Macromolecules* V (2019) 1-9.
- [55] R.R.S. Silva, C.R. Silva, V.F. Santos, C.R.S. Barbosa, D.F. Muniz, A.L.E. Santos, M.H.C. Santos, B.A.M. Rocha, K.L.R. Batista, L.M. Costa-Júnior, H.D.M. Coutinho, C.S Teixeira, *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*, *Microbial Pathogenesis* 135 (2019) 103629.
- [56] K.L.R. Batista, C.R. Silva, V.F. Santos, R.C. Silva, R.R. Roma, A.L.E. Santos, R.O. Pereira, P. Delatorre, B.A.M. Rocha, A.M.S. Soares, L.M. Costa-Júnior, C.S. Teixeira, Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*, *Molecular and Biochemical Parasitology* 225 (2018) 67-72.
- [57] E.A. Reyes-Montaña, N.A. Vega-Castro, Plant Lectins with Insecticidal and Insectistatic Activities. In: BEGUM, G. (Ed.). *Insecticides - Agriculture and Toxicology*. InTech, 2018.
- [58] J.G. Palharini, A.C. Richter, M.F. Silva, F.B. Ferreira, C.P. Pirovani, K.S.C. Naves, V.A. Goulart, T.W.P. Mineo, M.J.B. Silva, F.M. Santiago, Eutirucallin: A Lectin with Antitumor and Antimicrobial Properties, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (2017) 1-13.
- [59] A.C. Alves, M.A. Vasconcelos, M.Q. Santiago, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, P.H.S.F. Bringel, R.R. Castro, C. S. Nagano, P. Delatorre, L.A.G. Souza,

- K.S. Nascimento, A.M.S. Assreuy, B.S. Cavada, A novel vasorelaxant lectin purified from seeds of *Clathrotropis nitida*: partial characterization and immobilization in chitosan beads, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 588 (2015) 33-40.
- [60] Y. Kumaki, M.K. Wandersee, A.J. Smith, Y. Zhou, G. Simmons, N.M. Nelson, K.W. Bailey, Z.G. Ves, J.K.K. Li, P.K. Chan, D.F. Smee, D.L. Barnard, Inibição da replicação do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave em um modelo de rato letal SARS-CoV BALB/c por lectina de urtiga, *Urtica dioica* aglutinin", *Antiviral Research* , 90 (2011) 22–32.
- [61] B.S. Cavada, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, K.S. Nascimento, ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 30.
- [62] A.LE. Santos, C.P.S. Júnior, R.N.M. Neto, M.H.C. Santos, V.F. Santos, B.A.M. Rocha, E.M. Sousa, R.C. Carvalho, I. Menezes, M.R.C. Oliveira, L.B.R. Dantas, T.M. Silva, C.S. Teixeira, *Machaerium acutifolium* lectin inhibits inflammatory responses through cytokine modulation, *Process Biochemistry* 97 (2020) 149-157.
- [63] B.S. Cavada, M.T.L. Silva, V.J.S. Osterne, V.R. Pinto-Junior, C.F. Lossio, J.C. Madeira, M.G. Pereira, R.B. Leal, W.P. Ferreira, K.S. Nascimento, A.M.S. Assreuy, Exploring the carbohydrate-binding ability of *Canavalia bonariensis* lectin in inflammation models, *Journal Molecular Recognition* 33 (2020) 1-10.
- [64] J.T. Clemente-Napimoga, M.A.S.M. Silva, S.N.C. Peres, A.H.P. Lopes, C.F. Lossio, M.V. Oliveira, V.J.S. Osterne, K.S. Nascimento, H.B. Abdalla, J.M. Teixeira, B.S. Cavada, M.H. Napimoga, *Dioclea violacea* lectin ameliorates inflammation in the temporomandibular joint of rats by suppressing intercellular adhesion molecule-1 expression, *Biochimie* 158 (2019) 34-42.
- [65] C.F. Lossio, C.G. Moreira, R.M.F. Amorim, C.S. Nobre, M.T.L. Silva, C.C. Neto, V.R. Pinto-Junior, I.B. Silva, J. Campos, A.M.S. Assreuy, B.S. Cavada, K.S. Nascimento, Lectin from *Canavalia villosa* seeds: A glucose/mannose-specific protein and a new tool for inflammation studies, *International Journal of Biological Macromolecules* 105 (2017) 272-280.
- [66] A.F. Pires, N.V.F.C. Rodrigues, P.M.G. Soares, R.A. Ribeiro, K.S. Aragão, M. M. Marinho, M.T.L. Silva, B.S. Cavada, A.M.S. Assreuy, A novel N-acetyl-glucosamine lectin of *Lonchocarpus araripensis* attenuates acute cellular inflammation in mice, *Inflammation Research (Printed ed.)* 65 (2016) 43-52.

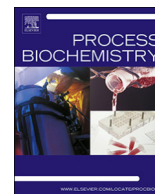
- [67] A.U. Bari, M.Q. Santiago, V.J.S. Osterne, V.R. Pinto-Junior, L.P. Pereira, J.C. Silva-Filho, H. Debray, B.A.M. Rocha, P. Delatorre, C.S. Teixeira, C.C. Neto, A.M.S. Assreuy, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, Lectins from *Parkia biglobosa* and *Parkia platycephala*: A comparative study of structure and biological effects, *International Journal of Biological Macromolecules* 92 (2016) 194-201.
- [68] V.R. Pinto-Junior, J.L. A. Correia, R.I. Pereira, F.N. Pereira-Junior, M.Q. Santiago, V.J.S. Osterne, J.C. Madeira, J.B. Cajazeiras, C.S. Nagano, P. Delatorre, A.M.S. Assreuy, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity, *Journal of Molecular Recognition*, 29 (2016) 134-141.
- [69] M.Q. Santiago, C.C.F. Leitão, F.N. Pereira-Junior, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, J.B. Cajazeiras, H.C. Silva, F.V.S. Arruda, L.P. Pereira, A.M.S. Assreuy, K.S. Nascimento, C.S. Nagano, B.S. Cavada, Purification, characterization and partial sequence of a pró-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams, *Journal of Molecular Recognition* 27 (2014) 117-123.
- [70] C.S. Teixeira, A.M.S. Assreuy, V.J.S. Osterne, R.M.F. Amorim, L.A.C. Brizeno, H. Debray, C.S. Nagano, P. Delatorre, A.H. Sampaio, B.A.M. Rocha, B.S. Cavada, Mannose-specific legume lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (FRIL) stimulates inflammatory and hypernociceptive processes in mice, *Process Biochemistry* 49 (2014) 529-534.
- [71] G.A. Bezerra, R. Viertlmayr, T.R. Moura, P. Delatorre, B.A.M. Rocha, K.S. Nascimento, J.G. Figueiredo, I.G. Bezerra, C.S. Teixeira, R.C. Simões, C.S. Nagano, N.M.N. Alencar, K. Gruber, B.S. Cavada, Structural Studies of an Anti-Inflammatory Lectin from *Canavalia boliviana* Seeds in Complex with Dimannosides, *Plos One* 9 (2014) e97015.
- [72] 10. H.C. Silva, A.U. Bari, B.A.M. Rocha, K.S. Nascimento, E.L. Ponte, A.F. Pires, P. Delatorre, E.H. Teixeira, H. Debray, A.M.S. Assreuy, C.S. Nagano, B.S. Cavada, Purification and primary structure of a mannose/glucose-binding lectin from *Parkia biglobosa* Jacq. seeds with antinociceptive and anti-inflammatory properties, *Journal of Molecular Recognition* 26 (2013) 470-478.
- [73] V.E.F. Abrantes, B.A.M. Rocha, R.B. Nóbrega, J.C. Silva-Filho, C.S. Teixeira, B.S. Cavada, C.A. A. Gadelha, S.H. Ferreira, J.G. Figueiredo, T. Santi-Gadelha, P. Delatorre, Molecular Modeling of Lectin-Like Protein from *Acacia farnesiana*,

Reveals a Possible Anti-Inflammatory Mechanism in Carrageenan-Induced Inflammation, *BioMed Research International* 2013 (2013) 1-9.

- [74] N.M.N. Alencar, R.S.B. Oliveira, J.G. Figueiredo, I.J.M. Cavalcante, M.P.V. Matos, F.Q. Cunha, J.V.S. Nunes, L.R. Bomfim, M.V. Ramos, An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models, *Inflamm. Res.* 59 (2010) 245–254.
- [75] T.B.A. Rangel, B.A.M. Rocha, G.A. Bezerra, A.M.S. Assreuy, A.F. Pires, A.S.F. Nascimento, M.J.B. Bezerra, K.S. Nascimento, C.S. Nagano, A.H. Sampaio, K. Gruber, P. Delatorre, P.M.B. Fernandes, B.S. Cavada, Crystal structure of a pro-inflammatory lectin from the seeds of *Dioclea wilsonii* Standl, *Biochimie* 94 (2012) 525-532.
- [76] A.M.S. Assreuy, M. D. Shibuya, G.J. Martins, M. L. P. de Souza, B.S. Cavada, R.A. Moreira, J.T.A. Oliveira, R.A. Ribeiro, C.A. Flores, Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans, *Mediators of Inflammation* 6 (1997) 201-210.
- [77] M.V. Martins, Leguminosas arbustivas e arbóreas de fragmentos florestais remanescentes no noroeste paulista, Brasil. Niterói: UNESP, 2009.
- [78] G.P. Lewis, B. Schire, B. Mackinder, M. Lock, Legumes of the world, Royal Botanic Gardens, Kew, 2005.
- [79] C.A. Polido, A.L.B. Sartori, O Gênero *Machaerium* (Leguminosae - Papilionoideae - Dalbergieae) no Pantanal Brasileiro. *Rodriguésia* 58 (2007) 313-329.

CAPÍTULO 2 – *Machaerium acutifolium* lectin inhibits inflammatory responses through cytokine modulation

Este capítulo apresenta o artigo “*Machaerium acutifolium* lectin inhibits inflammatory responses through cytokine modulation” publicado no periódico Process Biochemistry.



Machaerium acutifolium lectin inhibits inflammatory responses through cytokine modulation



Ana L.E. Santos^a, Cícero P.S. Júnior^b, Roberval N.M. Neto^c, Maria. H.C. Santos^a, Valdenice F. Santos^a, Bruno A.M. Rocha^d, Eduardo M. Sousa^c, Rafael C. Carvalho^a, Irwin R.A. Menezes^{b,**}, Maria R.C. Oliveira^b, Lindaiane B.R. Dantas^b, Tarcísio M. Silva^b, Claudener S. Teixeira^{e,*}

^a Agrarian and Environmental Sciences Center, Federal University of Maranhão, Chapadinha, Maranhão, Brazil

^b Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

^c Postgraduate Program in Microbial Biology, CEUMA, University of São Luís, Maranhão, Brazil

^d Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^e Educator Training Institute, Federal University of Cariri, Brejo Santo, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Agglutinin
Inflammation
LPS-stimulated macrophages

ABSTRACT

Inflammatory response occurs when tissues are injured by pathogens, trauma, toxins, or heat. Lectins are proteins that recognize and bind reversibly to glycans and glycoconjugates and can modulate inflammatory responses in *in vitro* and *in vivo* models. As such, this study aimed to evaluate the potential of an anti-inflammatory lectin isolated from *Machaerium acutifolium* seeds (MaL) in mice and LPS-stimulated macrophage models. The protein was solubilized in sterile saline (0.9 % NaCl) immediately before treatment of mice by intraperitoneal routes at doses of 0.02 mg/kg, 1 mg/kg and 5 mg/kg. MaL significantly decreased inflammation in the formalin test, inhibited cell migration in experimental models of carrageenan-induced peritonitis, and blocked the formation of paw edema induced by carrageenan and dextran. *In vitro* studies showed that MaL downregulated the proinflammatory cytokine genes inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), but upregulated the anti-inflammatory IL-10 gene in LPS-stimulated macrophages. Therefore, this study suggests that MaL has an anti-inflammatory effect relative to modulated levels of pro- and anti-inflammatory cytokines, indicating that MaL can be used as a potential therapeutic agent in cellular inflammatory events.

1. Introduction

Inflammation is generally defined as a response to stimulation by invading pathogens or endogenous signals, such as damaged cells. Such response can result in tissue repair, but excessive response can also have pathological consequences [1]. Inflammation is accompanied by several vascular events, such as vasodilation, leukocyte and interstitial fluid accumulation, sensitization of nociceptive terminals, and the release of proinflammatory mediators, such as kinins, nitric oxide and cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukins (ILs), such as IL-1 β and IL-6, released by monocytes/macrophages [2–4].

Monocytes are recognized as the most important immune effector cells [5]. Activated macrophages produce large quantities of prostaglandin E2 (PGE2) catalyzed by cyclooxygenase (COX-2), nitric oxide (NO) mediated by inducible NO synthase (iNOS), and proinflammatory

cytokines involved in upregulating inflammatory response. Host survival following infection depends on these activities to repair tissue injury [6], but their overproduction may result in inflammatory injury with many immunological consequences. Therefore, understanding cell signaling pathways in the context of inflammatory processes regulated by the expression levels of proinflammatory mediators, may be an effective foundation for developing treatment strategies for inflammatory diseases.

Lectins are a structurally heterogeneous group of proteins, or glycoproteins, with at least one noncatalytic domain binding reversibly to a specific mono- or oligosaccharide [7]. This protein group is widely distributed in nature, e.g., microorganisms, plants, animals and humans, acting as mediators of a wide range of biological events. Since lectins have such binding capacity, they become an important link in realizing protein-carbohydrate recognition, which affects cell

* Corresponding author at: Federal University of Cariri, Brazil.

** Corresponding author at: Regional University of Cariri, Brazil.

E-mail addresses: Irwin.alencar@urca.br (I.R.A. Menezes), claudener@gmail.com (C.S. Teixeira).

communication [8], host defense [9], fertilization [10], cell development [11], parasitic infection [12], tumor metastasis and inflammation [13,14].

Plant lectins are promising molecules in the study of inflammatory processes [15]. Depending on the administration route used, lectins can be both anti- or pro-inflammatory. Lectins act on different cell types, but demonstrate the same carbohydrate specificity through recognition of N-glycans with a trimannoside core. Lectins either compete with selectins *via* systemic injection or elicit innate immune response *via* local injection, both of which involve saccharide recognition [16]. It has been proposed that anti-inflammatory effects elicited by exogenous lectins result from the competitive blocking of glycosylated selectin binding sites in the membranes of leukocytes and/or endothelial cells [17]. In addition, many studies have been performed to evaluate the role lectins play in different models involving immune response and its products, e.g., the stimulation of pro- or anti-inflammatory mediators secreted by macrophages [16,18,19]. For example, Toll-like receptors (TLRs) play important roles in the initiation of innate immune response, in particular Gram-negative bacterial lipopolysaccharide (LPS), as detected by the presence of O-linked mannosyl proteins [20]. TLR4 triggers complex signaling cascades culminating in the induction of a myriad of proinflammatory cytokines and chemokines, including tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL)-6, IL-1, and chemokines, or chemoattractant cytokines [21].

Our group recently isolated a mannose/N-acetyl-D-glucosamine-specific lectin from *Machaerium acutifolium* seeds (MaL). This lectin is a glycoprotein with apparent molecular mass of 29 kDa (α -chain), 13 kDa (β -chain) and 8 kDa (γ -chain). It has the ability to reduce orofacial pain *via* transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) [22]. This study aimed to evaluate the potential anti-inflammatory effect of MaL in acute and chronic inflammation in murine models and LPS-stimulated macrophage cultures.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and reagents

Carrageenan, indomethacin, promethazine and dextran were purchased from Sigma Chemical Co. All other drugs and reagents used were of analytical grade.

2.2. Animals

Male Swiss mice (20–30 g) were obtained from the animal care facilities of the Regional University of Cariri, Brazil. They were housed in environmentally controlled conditions ($22 \pm 3^\circ\text{C}$, 12 h light/12 h dark cycle) with free access to standard diet and tap water. After one week of acclimatization, the mice were randomly divided into groups (6–8 in each group) for *in vivo* assays. All animals were treated in compliance with the ethical standards established by the National Guidelines for the Use of Experimental Animals of Brazil and by Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of the European Union. The experiments were performed after approval of the Committee for the Ethical Use of Animals of the Regional University of Cariri (CEUA-URCA Proc. N^o 00066/2019.2).

2.3. Plant material

M. acutifolium seeds were collected from plants located at Crato, Ceará, Brazil. The plant was identified in the Herbarium Dárdano de Andrade-Lima/Regional University of Cariri, number 13,480, and registered in SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID: A6D883E).

2.4. Purification of MaL

The purification of MaL used a protein fraction obtained with 60 % ammonium sulfate precipitation loaded into an affinity (mannose-agarose) column, followed by anionic exchange chromatography (DEAE) according to the method described by Santos et al. [22]. For purity analysis, lyophilised samples of MaL were submitted to electrophoresis under non-reducing conditions (SDS-PAGE 15 %), following the method described by [23]. Coomassie Brilliant Blue (R-250) at 0.1 % was used to reveal protein bands, and a solution containing 40 % of methanol and 10 % acetic acid was used to remove excess Coomassie. MaL was solubilised in sterile saline (0.9 % NaCl) immediately before administration to mice and macrophages to investigate anti-inflammatory activity. Total protein concentrations of MaL samples were estimated following the Bradford method [24]. The purified protein fraction was used in the biological assays, and the concentrations were defined based on previous *in vivo* [14,22] and *in vitro* [25] studies.

2.5. *In vivo* anti-inflammatory activity

Acute models of central and peripheral nociception, as well as the chronic granuloma model by cotton pellets, were used to evaluate anti-inflammatory activity. Anti-edematogenic plethysmometry and protein extravasation by peritonitis were performed, along with determining leukocyte migration.

The animals were divided in groups of six (3 males and 3 females; $n = 6$) using different MaL concentrations (0.02, 1.0 and 5.0 mg/kg), negative control (saline) and two positive controls (indomethacin and promethazine).

2.5.1. Formalin test

The animals were pretreated with 0.9 % saline, indomethacin 10 mg/kg, and MaL at 0.02, 1.0 and 5.0 mg/kg (i.p.). After 30 min, 2.5 % formalin was injected into the right hind paw. The time spent paw licking was timed for a period of 0–5 min after formalin administration, corresponding to Phase 1, or the neurogenic phase, and for a period of 25–40 min, corresponding to Phase 2, or the inflammatory phase [26,27].

2.5.2. Paw edema induced by intraplantar injection of carrageenan or dextran

The animals had a baseline measurement of their hind paw volume, as measured by plethysmometry. Subsequently, the animals were pretreated orally with 0.9 % saline, 10 mg/kg indomethacin (positive control in carrageenan-induced edema), 6 mg/kg promethazine (positive control of dextran-induced edema) and 0.02, 1.0, and 5.0 mg/kg of MaL. After 1 h, the animals received 1% carrageenan or 1% dextran (20 μL /paw) in the right hind paw and vehicle in the left hind paw. The volume of each animal's hind paw was recorded 1, 2, 3 and 4 h after injection of phlogistic agent [28,29].

2.5.3. Peritonitis

Mice were treated (i.p) with 0.9 % saline solution, 10 mg/kg indomethacin, and MaL at 1.0 mg/kg (i.p), the lowest effective dose evidenced in the previous tests. The naive group received no treatment or induction. Thirty minutes after treatment, the animals received an intraperitoneal injection of 1% carrageenan. After 4 h, the animals were euthanized, and 3 mL of heparinized PBS were injected into the peritoneal cavity. The peritoneal lavage sample was read in an ABX Micros 60 (Horiba) [30].

2.5.4. Vascular permeability extravasation and myeloperoxidase assay

To evaluate anti-edematogenic activity, mice received the same treatment described in item 2.5.3, and after 1 h, the animals received an intraperitoneal injection of carrageenan. The animals were sacrificed after the fourth hour, and the peritoneal cavity was injected with 3 mL

of heparinized PBS (10 IU/mL) and slowly massaged. Samples of peritoneal fluid were collected and analyzed by an SDH-20 apparatus (Labtest) for evaluation of leukocyte migration. Albumin was determined in the peritoneal fluid by colorimetric assay using Labtest® producer (Lagoa Santa/MG Brasil CEP 33400–000). Samples were homogenized in HTAB buffer (Sigma-Aldrich, Brazil) and centrifuged at 2500 x g for 7 min at 4 °C to determine myeloperoxidase (MPO) activity. The activity was measured by colorimetric assay in absorbance at 450 nm. The absorbance change was recorded and plotted on the standard MPO curve. The final values were record as MPO activity U/mg of tissue as the amount of enzyme required to convert 1 μmol/min of H₂O₂ into water at 22 °C [31–33].

2.5.5. Chronic inflammation by granuloma assay

Four cotton pellets, weighing 10 mg (0.01 g) each, were placed on the dorsum of mice anesthetized with 80 mg/kg ketamine and 20 mg/kg xylazine. The animals were treated (i.p) with 0.9 % saline and 1.0 mg/kg MaL, the lowest effective dose evidenced in the previous tests. This assay lasted ten days, and the treatment was performed daily. On the tenth day, the animals were sacrificed, and the cotton pellets were removed from the dorsal region, dried for 24 h at 37 °C in an incubator, and weighed [34]. Then, a homogenate from the pellets was made for total protein dosage. A biuret was then applied to the homogenate; it contained a reagent that reacts to proteins present in the sample by developing a purple coloration proportional to the protein concentration. A standard solution of 40 mg/mL of albumin was used as a positive control for the reaction. After 10 min, the sample was read using a 550 nm spectroscopy filter [35].

2.6. In vitro anti-inflammatory activity

2.6.1. Cytotoxicity assay

Murine RAW 264.7 cells were maintained in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich®) supplemented with L-glutamine and sodium bicarbonate, streptomycin 100 μg/mL, and penicillin 100 UI/mL. After growth was established, cells were plated in 96-well plates at 2 × 10⁵ cells/well and treated with MaL (0.1 μg/mL to 31.25 μg/mL). RPMI 1640 and 0.05 % Triton X were positive and negative controls, respectively. The plate was incubated at 37°C and 5% CO₂. After 24 h, the medium of each well was removed, and RPMI 1640 medium containing 5 mg/mL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich®) was added to each well. The plates were incubated for 4 h at 37 °C and 5% CO₂ in the dark. The supernatants were discarded, and the formazan crystals were dissolved in 100 μL dimethyl sulfoxide (DMSO). Absorbance was read at 540 nm using a microplate reader (Thermo Plate), and the results were expressed as a percentage of the maximal value of the positive control and reported as means of three independent assays ± the standard deviation.

2.6.2. mRNA quantification

Cytokines, TLR (2/4), and iNOS mRNA were quantified on RAW 264.7 cultures. Cells were plated in 96-well plates at 2 × 10⁵ cells/well and treated with MaL (0.1 μg/mL to 31.25 μg/mL) and LPS (10 ng/mL) for 24 h. Supernatants were removed from cell samples, and wells were rinsed twice with sterile saline. RNA was isolated from cell samples using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen®), according to the manufacturer's instructions. The quality of mRNA was assessed by spectrophotometry (NanoDrop One/One C, Thermo Fisher Scientific).

2.6.2.1. cDNA synthesis. For synthesis of cDNA, 500 ng RNA were used with the Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) and primed with random hexamers, according to the manufacturer's instructions. The resultant cDNA was stored at –20 °C until RT-qPCR when it was diluted 1/10 in RNase/DNase-free water.

Table 1
Primers used in RT-qPCR.

TNF-α	Forward: 5'- CGGCATGGATCTCAAAGACAAC -3' Reverse: 5'- AAATCGGCTGACGGTGTGG -3'
INOS	Forward: 5'-CGAAACGCTTCACTTCCAA -3' Reverse: 5'- TGAGCCTATATTGCTGCTGTGGCT -3'
TLR2	Forward: 5'- GGA GCCACCATTTCCACGGACT -3' Reverse: 5'- GGCTTCTCTTGGCCTGG -3'
TLR4	Forward: 5'- TGACAGGAAACCTATCCAGAGTT-3' Reverse: 5'- TCTCCACAGCCACCAGATTCT -3'
IL-10	Forward: 5'- TCATTCCGATAAGGCTTGG-3' Reverse: 5'- TGCTATGCTGCCTGCTCTTA -3'
GAPDH	Forward: 5'- TGAAGTCCGTGTGAACGG -3' Reverse: 5'- CGTGAGTGGAGTCACTACT -3'

2.6.2.2. RT-qPCR. RT-qPCR was performed using the QuantStudioFlex6 K instrument (Applied Biosystems). GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) gene expression assays listed in Table 1 were used according to the manufacturer's instructions with cDNA (5 ng) in technical triplicates. The PCR program was as follows: activation (50 °C, 2 min), inactivation (95 °C, 10 min), followed by 40 cycles of denaturation (95 °C, 15 s) and annealing/extension (60 °C, 1 min). The mean Ct values were calculated from technical triplicates. The ΔΔCt method was used to calculate fold change in expression [36]. Samples with Ct values greater than 35 were considered negative; however, for the purpose of calculating a fold change, these samples were assigned a Ct value of 35. The mean ΔCt value of the control (untreated) samples was calculated, and individual ΔCt values were calculated for experimental replicates, as ΔCt = Ct target gene – Ct reference gene (Gapdh). The ΔΔCt value for each sample was calculated as the ΔCt sample – mean ΔCt reference gene. This was then transformed into a fold change value for each sample using the calculation 2^{-ΔΔCt}. The primer sequences used in that assay were represented in Table 1 and were designed by DNA Express Biotecnologia LTDA and based on gene sequences deposited in GenBank. The housekeeping gene used was GAPDH.

2.7. Statistical analysis

All data were subjected to analysis using the GraphPad Prism 5.0 software. The comparison procedure used was a One-way ANOVA or Two-way ANOVA, and Tukey's test was applied as a post hoc test for both cases. In all statistical analyses, the values were represented by the mean ± standard error of the mean (SEM), and all values that obtained p < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Protein purification

MaL was purified according to Santos et al. [22], and the purity was confirmed by electrophoresis. The sample was used in *in vivo* and *in vitro* tests.

3.2. MaL inhibits the nociception induced by formalin

Paw licking time was increased in response to formalin in both phases. During the neurogenic stage (0–5 min) of the formalin test, MaL administration at 0.02, 1.0 and 5.0 mg/kg significantly reduced paw licking time by 42.64 % (p < 0.01), 68.40 % (p < 0.0001) and 59.35 % (p < 0.001), respectively, when compared to control (Fig. 1). During the inflammatory phase (15–30 min), the animals treated with MaL at the concentrations of 0.02, 1.0 and 5.0 mg/kg reduced paw licking time by 50.64 % (p < 0.001), 67.84 % (p < 0.0001) and 65.60 % (p < 0.0001), respectively, when compared to control (Fig. 1).

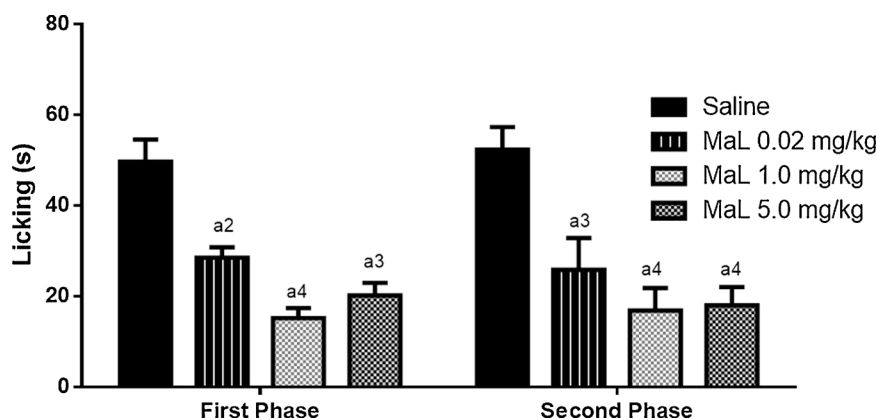


Fig. 1. Effect of MaL on the formalin test. Values represent the arithmetic mean \pm S.E.M. (standard error of the mean). One-way ANOVA, followed by the Tukey test. a4: $p < 0.0001$ vs. saline; a3: $p < 0.001$ vs. saline; a2: $p < 0.01$ vs. saline.

3.3. Anti-edematogenic effect

In carrageenan-induced paw edema, MaL inhibited the edema time-course induced by carrageenan (300 μ g/paw; s.c.) in doses tested. In the first hour after induction (T1), MaL (0.02, 1.0 and 5.0 mg/kg) reduced edema by 36.36 %, 46.46 %, and 44.44 %, respectively, when compared to the control group. When the effect of MaL at T2 was verified, the inhibition percentage was 40.00 %, 55.45 % and 41.82 %, respectively. When we observed the effect of MaL at T3, we noticed a decrease in inhibition caused by MaL with values of 33.90 %, 50.85 % and 41.53 %, respectively. At T4, all concentrations continued to promote inhibitory effect with values of 47.86 %, 59.29 % and 54.29 %, respectively, and at this time, the greatest inhibitory potential of MaL in edema was observed. Indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, had anti-edematogenic effect during all evaluation hours with the respective values of 38.38 %, 57.27 %, 63.56 % and 62.14 % (Fig. 2).

In the dextran-induced paw edema model, MaL (0.02, 1.0 and 5.0 mg/kg) at time 1 presented a reduction in the percentage of edema of 34.04 %, 34.04 % and 18.09 %, respectively. At time 2, edema inhibition was reduced at the lowest dose compared to T1, in which the inhibitory percentages were 26.55 %, 30.09 %, and 31.86 %, respectively. The effect of MaL at time 3 showed a decrease in edema by 31.45 %, 41.13 %, and 41.13 %, respectively. In the fourth and last hour, all doses inhibited edema with percentages of 31.45 %, 41.13 %, and 41.13 %, respectively. Promethazine reduced edema efficiently at 50.00 %, 55.75 %, 70.16 % and 68.75 % in T1 to T4, respectively (Fig. 3).

3.4. Peritonitis and vascular permeability

In the acute peritoneum carrageenan-induced inflammation test, MaL (1.0 mg/kg) reduced 68 % of the leukocyte count compared to the

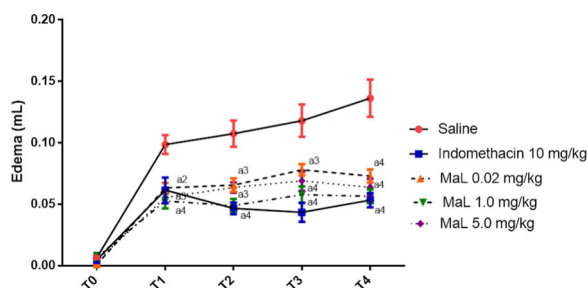


Fig. 2. Effect of MaL on paw edema induced by carrageenan. Values represent the arithmetic mean \pm S.E.M. (standard error of the mean). Two-way ANOVA, followed by the Tukey test. T1: 1 h after induction; T2: 2 h after induction; T3: 3 h after induction; T4: 4 h after induction. a4: $p < 0.0001$ vs. saline; a3: $p < 0.001$ vs. saline; a2: $p < 0.01$ vs. saline.

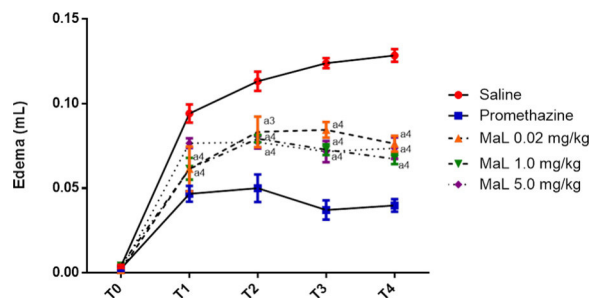


Fig. 3. Effect of MaL on paw edema induced by dextran. Values represent the arithmetic mean \pm S.E.M. (standard error of the mean). Two-way ANOVA, followed by the Tukey test. T1: 1 h after induction; T2: 2 h after induction; T3: 3 h after induction; T4: 4 h after induction. a4: $p < 0.0001$ vs. saline; a3: $p < 0.001$ vs. saline; a2: $p < 0.01$ vs. saline.

saline group (Fig. 4A). Total leukocyte migration was indirectly determined using MPO activity (Fig. 4B). Treatment with MaL (1.0 mg/kg) significantly prevented the increase in MPO activity induced by carrageenan by 67 %.

In addition, MaL (1.0 mg / kg) reduced carrageenan-induced albumin extravasation by 34 % when compared to the saline group (Fig. 5). Indomethacin (reference drug) also reduced albumin extravasation by 62.2 % when compared to the saline group.

3.5. Granuloma

When the pellets were weighed on an analytical balance, the groups treated with MaL (1.0 mg/kg) showed a significantly lower weight (g) than that of the group treated with saline in which this difference was expressed in pellets with masses 24.32 % lower than the saline group (Fig. 6A).

In the absorbance analysis of the homogenate from the pellets, the groups treated with MaL (1.0 mg/kg) showed a reduction of this absorbance by 36.41 % compared to the saline group, demonstrating a lower value in the number of total proteins in these groups in relation to control (Fig. 6B).

3.6. Cytotoxicity assay

MaL did not decrease cell viability in RAW 264.7 cells at a concentration of 31.25 μ g/mL (Fig. 7), indicating the absence of cytotoxicity against these cells. Therefore, we used MaL at 0.1 μ g/mL to investigate the inhibitory effect on LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells.

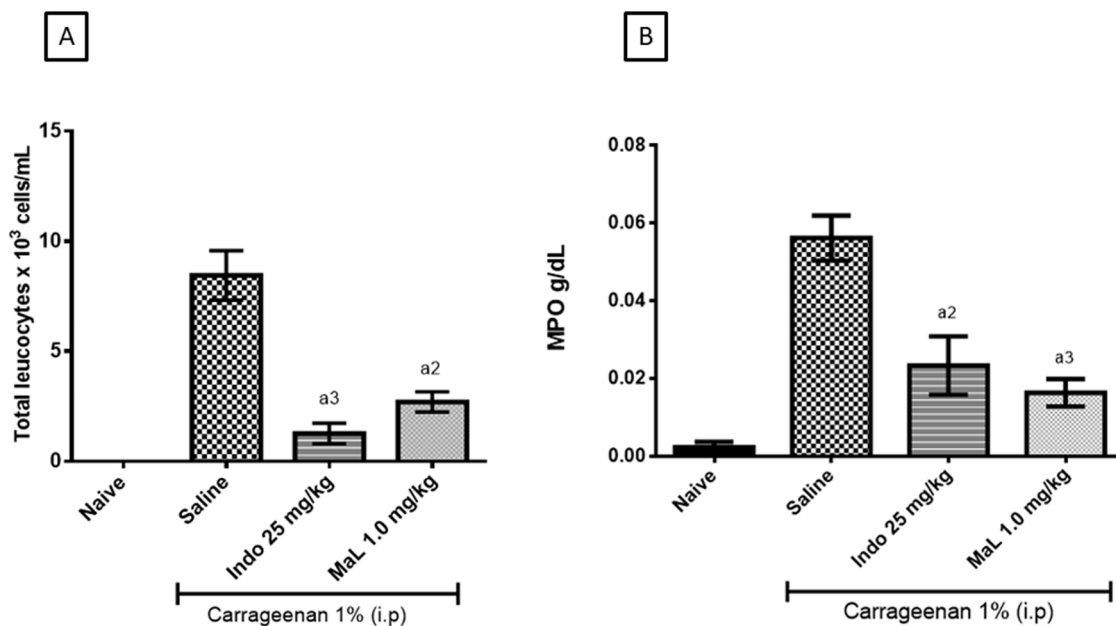


Fig. 4. Effect of MaL on the percentage of leukocytes (lymphocytes) and on vascular permeability. Values represent the arithmetic mean \pm S.E.M. (standard error of the mean). (A) Percentage of lymphocytes. (B) Dosage of MPO in peritoneal fluid. One-way ANOVA, followed by the Tukey test. a2: $p < 0.01$ vs. saline; a3: $p < 0.001$ vs. saline.

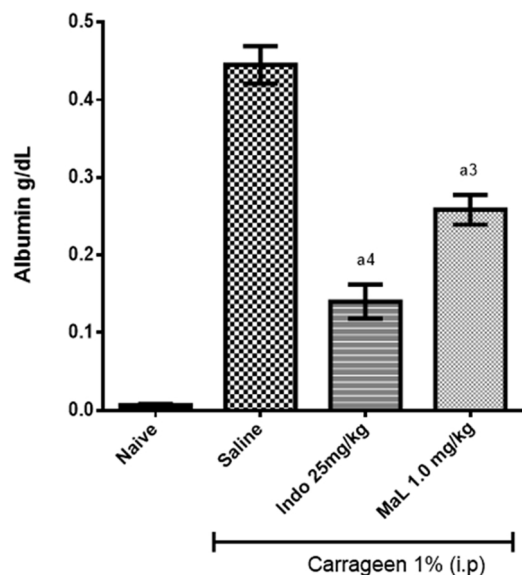


Fig. 5. Effect of MaL on protein extravasation in carrageenan-induced peritonitis. a4: $p < 0.0001$ vs. carrageenan and a3: $p < 0.001$ vs. carrageenan. ANOVA, followed by the Tukey test.

3.7. Cytokine mRNA quantification

The expression of TNF- α , TLR 2–4, iNOS (for M1 lineage) and IL-10 (for M2 lineage) was evaluated to obtain information about polarization of macrophage types. Within 24 h, RT-PCR analysis showed that TNF α expression was increased when macrophages were stimulated with LPS (0.24 ± 0.032 -fold), but the treatment of $0.1 \mu\text{g/mL}$ (0.11 ± 0.01 -fold) and $10 \mu\text{g/mL}$ (0.16 ± 0.06 -fold) of MaL reduced gene expression of this cytokine (Fig. 8A). Notably, the gene expression of IL-10 demonstrated upregulation, but only in the group treated with MaL at the concentration of $10 \mu\text{g/mL}$ (0.6 ± 0.43 -fold) (Fig. 8B). This result was an important observation of the activity of MaL in cytokine modulation. Gene expression of TLR-4 was decreased in macrophages treated with MaL at $0.1 \mu\text{g/mL}$ (0.07 ± 0.01 -fold) and $10 \mu\text{g/mL}$

(0.11 ± 0.05 -fold) compared to the LPS-stimulated macrophage group (0.29 ± 0.06 -fold) (Fig. 8C). In addition, gene expression of TLR-2 in macrophages was decreased in macrophages treated with MaL at the concentration of $0.1 \mu\text{g/mL}$ (0.22 ± 0.01 -fold) and $10 \mu\text{g/mL}$ (0.11 ± 0.03 -fold) compared to the LPS-stimulated macrophage group (0.38 ± 0.06 -fold) (Fig. 8D). The iNOS expression showed a significant reduction in groups treated with 0.1 – $10 \mu\text{g/mL}$ (2.10 ± 0.69 - and 1.94 ± 0.56 -fold, respectively) of MaL and LPS compared to LPS-stimulated macrophages (7.07 ± 0.03 -fold) (Fig. 8E).

4. Discussion

The ability of lectins to bind carbohydrates has long been recognized as an important biological event. This chemical interaction has become particularly important as it induces a wide range of unpredictable biological responses [37]. Lectins obtained from plants were reported as modulators in immune responses, contributing to the resolution of inflammatory processes [38].

MaL demonstrated an efficient response to phase 1 and phase 2 of the formalin-induced test. These results may indicate an inhibition of central or neurogenic pain and peripheral pain, as well as inflammatory mediators (histamine, bradykinin, prostaglandins, substance P, cytokines and serotonin) [39]. According to Pires et al. [40], the lectin from *Lonchocarpus campestris* also showed an effect in both phases of the formalin assay, however, the effect was observed at a ten-fold dose over that found for MaL.

Central-acting drugs, such as opioids, inhibit the two phases of the formalin test, while drugs that act at the peripheral level, such as NSAIDs, tend to inhibit the late phase [41,42]. Lectins may present analgesic potential, suggesting that the probable mechanism of action may be as an opioid agonists to COX enzymes [43] and modulators of cytokine expression [44].

Carrageenan is a sulfated polysaccharide widely used as a phlogistic agent promoting acute inflammation and inducing a proinflammatory response [45–47]. The response to its induction is characterized by a biphasic inflammatory process wherein the first phase lasts up to 2 h with rapid production of mediators, such as histamine, serotonin and bradykinin [48,49]. In the second, or late, phase that lasts between 3 and 6 h, prostaglandins release mainly prostaglandin E₂, contributing

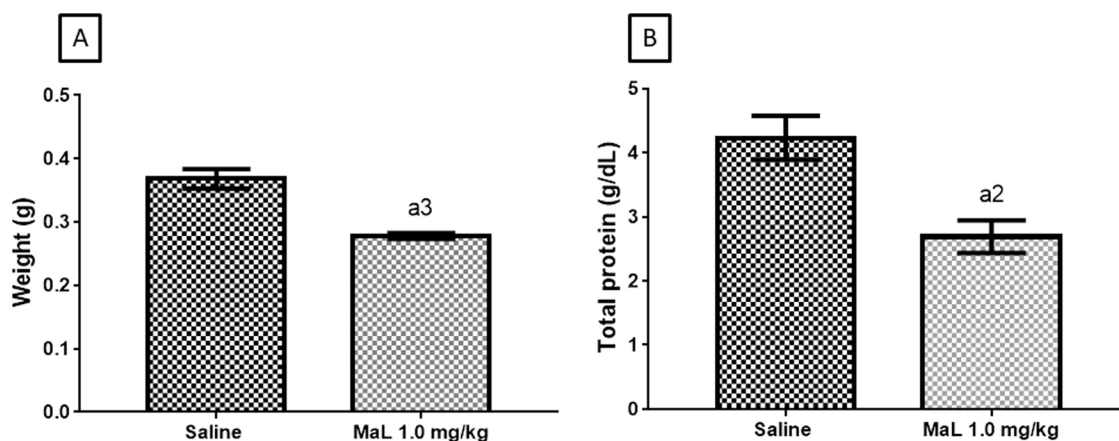


Fig. 6. Effect of MaL on granuloma. Values represent the arithmetic mean \pm S.E.M. (standard error of the mean). (A) Mass of the pellets. (B) Total proteins (absorbance of pellet homogenate). One-way ANOVA, followed by the Tukey test. a2: $p < 0.01$ vs. saline; a3: $p < 0.001$ vs. saline.

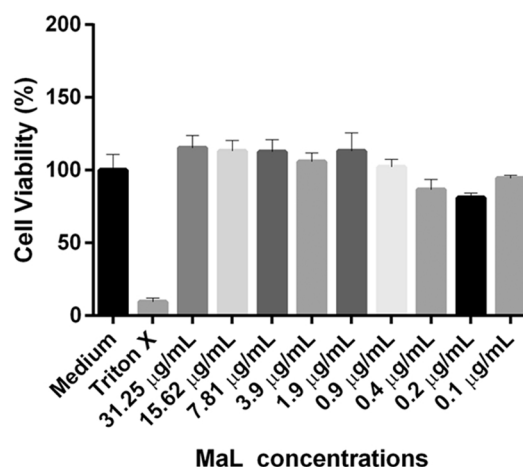


Fig. 7. Cell viability effects of MaL. Cell viability of MaL lectin towards RAW 264.7 cells determined by MTT assay after 24 h of incubation. Values represent the arithmetic mean \pm S.E.M. (standard error of the mean) of the results in triplicate. *Group shows a significant difference ($p < 0.05$) from the Medium group by Student's *t*-test, and #group shows a significant difference ($p < 0.05$) from all other groups.

to an increase in vascular permeability, producing edema and the mobilization of leukocytes [50,51]. Proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β , are released, as well as nitric oxide (NO) [52–54].

Modulation of gene expression of late proinflammatory mediators (TNF- α , and iNOS) was observed in the LPS-stimulated macrophage model. MaL could reduce TNF- α and iNOS gene expression and increase IL-10 (anti-inflammatory cytokine) production. TNF- α and NO play crucial roles in the late inflammatory process, stimulating the production of proinflammatory cytokines [55] and modulating leukocyte – endothelial cell interaction [56].

TNF- α was originally described as a circulating factor that could cause the death of tumor cells. However, since its identification, it has become well known as a regulator of inflammatory response. According to Zelová and Hošek [57], TNF- α is one of the most important proinflammatory cytokines, as its intracellular signaling influences the typical inflammatory characteristics of an organism. The central role of TNF- α in inflammation has been demonstrated Bradley [58] in experiments with agents that block the action of TNF- α , demonstrating its importance in the inflammatory process in a series of inflammatory conditions.

Couper et al. [59] described the anti-inflammatory cytokine IL-10 as an inhibitor of Th1 and NK cellular activity, as well as macrophages. IL-10 inhibits the expression of MHC class II and the costimulating

molecule B7–1/B7–2 in monocytes and macrophages by regulating the production of proinflammatory cytokines, including IL-1 α and β , IL-6, IL-12, IL-18 and TNF- α , and chemokines, including MCP1, MCP5, RANTES, IL-8, IP-10 and MIP-2), all of which can be characterized as anti-inflammatory cytokines.

Macrophages play a critical role in the inflammatory process through the production of various cytokines [5]. Depending on the different forms of macrophage stimulation, these cells can be classified as M1 and M2 macrophages. M1, classically activated macrophages, express inflammation-related enzymes (iNOS) and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, and MIP-1) when stimulated by LPS or IFN- γ . However, M2, considered alternatively activated macrophages, play an anti-inflammatory role in which IL-10 is expressed [61].

Our study was carried out with macrophages, and it is important to highlight that they are a heterogeneous population of immune cells that play several roles in inflammatory responses and immune homeostasis. Broad functional spectrum depends on the heterogeneity and plasticity of these cells, which are highly specialized in detecting the micro-environment and modifying its properties accordingly. It is clear that macrophages are cells with high plasticity and adaptability and that they can be differentiated in both proinflammatory (M1) and anti-inflammatory / pro-resolving (M2) profiles.

According to Viola et al. [60], M1 macrophages secrete TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, and M2 macrophages secrete IL-10 and TGF- β , which provided us with the opportunity to evaluate the biological effects of MaL on macrophages, as demonstrated in our findings, as well as the specificity of these cytokines on inflammatory response.

These results suggest that MaL exerts its anti-inflammatory properties by inhibiting the gene expression of proinflammatory mediators and that this effect may be partly the result of polarization of macrophage activation toward the M2 subtype, rather than M1. Macrophage polarization to M2 subtype and resultant gene modulation of pro-inflammatory cytokines may be related to a reduction of leukocyte infiltration and reduction of MPO activity in the peritoneal cavity, as promoted by MaL in mice [62]. Furthermore, the literature reports that plant lectins may also exert competitive blockade of glycosylated selectin binding sites on leukocyte membranes and/or endothelial cells, thereby reducing leukocyte infiltration at the site of infection [17].

In the granuloma assay, MaL reduced the weight and total proteins of the pellet homogenate. The *in vivo* granuloma assay induced by cotton pellets is widely used to evaluate the triggering of gradual chronic inflammation [63]. NSAIDs, glucocorticoids and other non-proliferative compounds decrease granulomatous tissue formation, as reflected in the decrease in granuloma dry weight owing to the attenuation of the proliferative phase of the process by these agents [64,65]. This result corroborates the anti-inflammatory action of MaL,

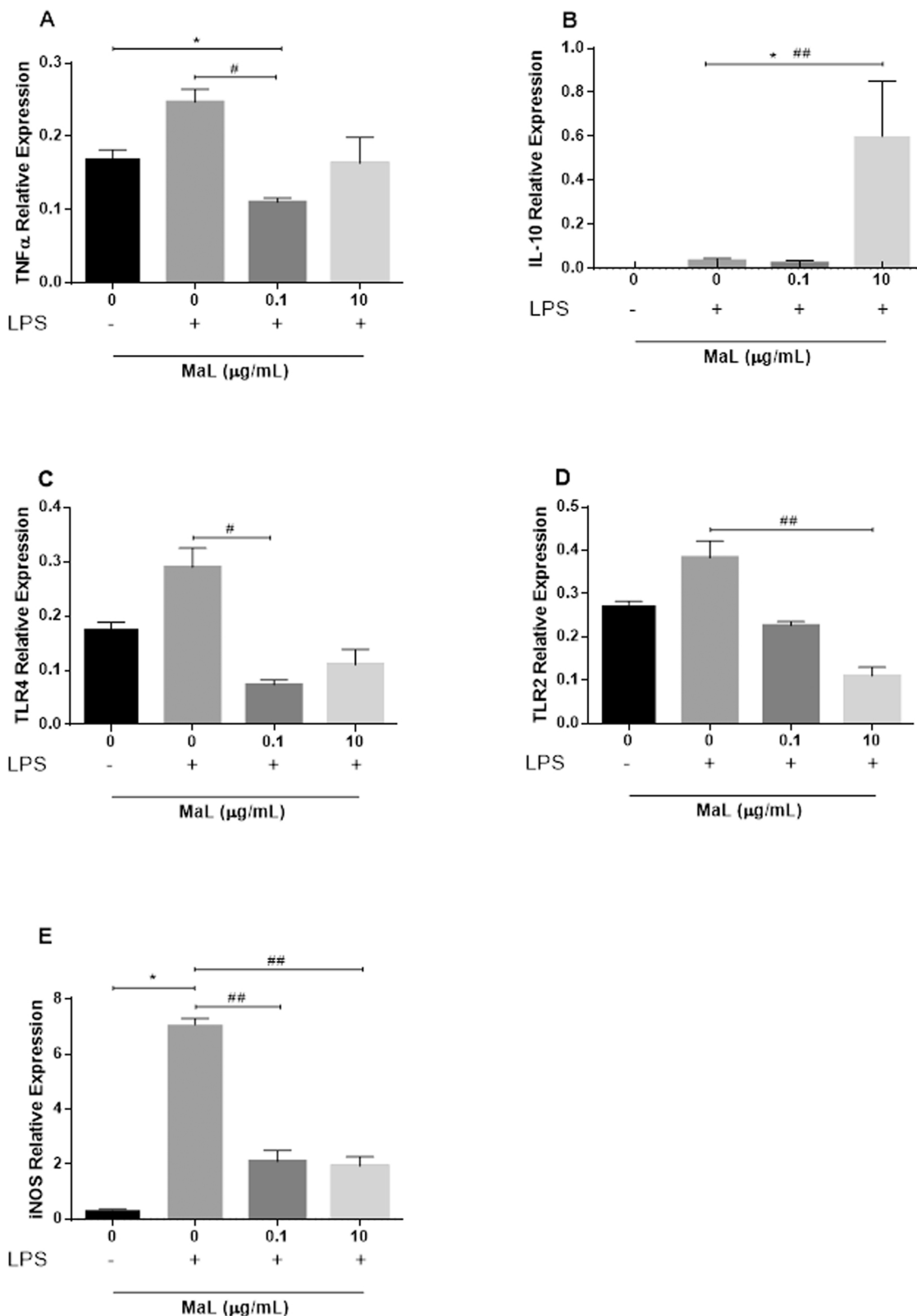


Fig. 8. Modulation of host cytokine gene expression in RAW 264.7 cells stimulated with LPS and MaL. The mRNA was extracted after 24 h of culture. Levels of mRNA were quantified by real-time PCR using gene-specific primers for cytokine genes. Differences in gene expression are represented by $\Delta\Delta C_t$ values of three biological and three technical replicates. * $p < 0.05$ for ANOVA (non-parametric) test. ** $p < 0.01$ for ANOVA (non-parametric) test.

as observed in the vascular permeability and leukocyte migration assays, indicating possible interference with leukocyte and protein migration in the proliferative phase.

5. Conclusion

In conclusion, MaL has both *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity. The mechanisms of action involved in the anti-inflammatory effect of MaL are associated with the modulation of iNOS and both pro- and anti-inflammatory cytokine genes; however, the mechanisms of action of MaL still require further studies for better understanding.

CRedit authorship contribution statement

Ana L.E. Santos: Data curation, Formal analysis, Methodology. **Cícero P.S. Júnior:** Data curation, Formal analysis, Methodology. **Roberval N.M. Neto:** Data curation. **Maria. H.C. Santos:** Data curation. **Valdenice F. Santos:** Formal analysis. **Bruno A.M. Rocha:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Eduardo M. Sousa:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Rafael C. Carvalho:** Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Irwin R.A. Menezes:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Maria R.C. Oliveira:** Formal analysis, Methodology. **Lindaiane B.R. Dantas:** Formal analysis, Methodology. **Tarcísio M. Silva:** Formal analysis, Methodology. **Claudener S. Teixeira:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Resources, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

No conflict of interest.

Acknowledgements

This study was partly funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Finance Code 001 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). BAMR and IRAM are senior investigators of CNPq.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.012>.

References

- [1] A current view on inflammation, *Nat. Immunol.* 18 (2017) 825–825.
- [2] R. Medzhitov, Inflammation 2010: new adventures of an old flame, *Cell* 140 (2010) 771–776.
- [3] V. Kumar, A.K. Abbas, J.C. Aster, Robbins – basic pathology, Elsevier Saunders, Philadelphia (2013) 29–73.
- [4] R.C.S. Sá, L. Andrade, R. Oliveira, D. Sousa, A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils, *Molecules* 19 (2014) 1459–1480.
- [5] P. Lacy, Editorial: Secretion of cytokines and chemokines by innate immune cells, *Front. Immunol.* 6 (2015) 190.
- [6] H.L. Sang, L. Hyesook, K.C. Jae, Anti-inflammatory effect of water extracts obtained from doenjang in LPS-stimulated RAW 264.7 cells, *Food Sci. Technol.* 39 (2019) 947–954.
- [7] E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans, A. Barre, P. Rougé, Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles, *Crit. Rev. Plant Sci.* 17 (1998) 575–692.
- [8] K. Niegelhell, T. Ganner, H. Plank, E. Jantscher-Krenn, S. Spirk, Lectins at interfaces—an atomic force microscopy and multi-parameter-Surface plasmon resonance study, *Materials* (Basel) 11 (2018) E2348.
- [9] W.C. Ng, M.D. Tate, A.G. Brooks, P.C. Reading, Soluble host defense lectins in innate immunity to influenza virus, *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (2012) 732191.
- [10] S. Defaus, M. Avilés, D. Andreu, R. Gutiérrez-Gallego, Lectin-binding specificity of the fertilization-relevant protein PDC-109 by means of surface plasmon resonance and carbohydrate recognition domain excision-mass spectrometry, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) E1076.
- [11] J. Matsumoto, C. Nakamoto, S. Fujiwara, T. Yubisui, K. Kawamura, A novel C-type lectin regulating cell growth, cell adhesion and cell differentiation of the multipotent epithelium in budding tunicates, *Development* 128 (2001) 3339–33347.
- [12] K.L.R. Batista, C.R. Silva, V.F. Santos, R.C. Silva, R.R. Roma, A.L.E. Santos, R.O. Pereira, P. Delatorre, B.A.M. Rocha, A.M.S. Soares, L.M. Costa-Júnior, C.S. Teixeira, Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 225 (2018) 67–72.
- [13] V. Vigneshwaran, P. Thirusangu, B.R. Vijay Avin, V. Krishna, S.N. Pramod, B.T. Prabhakar, Immunomodulatory glc/man-directed *Dolichos lablab* lectin (DLL) evokes anti-tumour response *in vivo* by counteracting angiogenic gene expressions, *Clin. Exp. Immunol.* 189 (2017) 21–35.
- [14] C.S. Teixeira, A.M.S. Assreuy, V.J.S. Osterne, R.M.F. Amorim, L.A.C. Brizeno, H. Debray, C.S. Nagano, P. Delatorre, A.H. Sampaio, B.A.M. Rocha, B.S. Cavada, Mannose-specific legume lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (FRIL) stimulates inflammatory and hypernociceptive processes in mice, *Process. Biochem.* 49 (2014) 529–534.
- [15] A.F. Pires, G.F.O. Marques, N.M.N. Alencar, M.G.Q. Martins, M.T.L. Silva, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, A.M.S. Assreuy, Inhibitory effect of *Lonchocarpus araripensis* lectin in rat acute models of inflammation, *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 91 (2019) e20180991.
- [16] B.A. Rocha, P. Delatorre, T.M. Oliveira, R.G. Benevides, A.F. Pires, A.A. Sousa, L.A. Souza, A.M. Assreuy, H. Debray, W.F. Azevedo, A.H. Sampaio, B.S. Cavada, Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*, *Biochimie* 93 (2011) 806–816.
- [17] A.M. Assreuy, G.J. Martins, E.E. Moreira, G.A. Brito, B.S. Cavada, R.A. Ribeiro, C.A. Flores, Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins, *J. Urol.* 161 (1999) 1988–1993.
- [18] L.C. Araújo, J.S. Aguiar, T.H. Napolão, F.V. Mota, A.L. Barros, M.C. Moura, M.C. Coriolano, L.C. Coelho, T.G. Silva, P.M. Paiva, Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds, *PLoS One* 8 (2013) e81973.
- [19] M.A. Souza, F.C. Carvalho, L.P. Ruas, R. Ricci-Azevedo, M.C. Roque-Barreira, The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on RnIPM properties, *Glycoconj. J.* 30 (2013) 641–657.
- [20] M.G. Netea, N.A.R. Gow, C.A. Munro, S. Bates, C. Collins, G. Ferwerda, R.P. Hobson, G. Bertram, H.B. Hughes, T. Jansen, L. Jacobs, E.T. Buurman, K. Gijzen, D.L. Williams, R. Torensma, A. McKinnon, D.M. MacCallum, F.C. Odds, J.W.M. Van der Meer, A.J.P. Brown, B.J. Kullberg, Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 1642–1650.
- [21] W. Wang, Z. Deng, H. Wu, Q. Zhao, T. Li, W. Zhu, X. Wang, L. Tang, C. Wang, S. Cui, H. Xiao, J. Chen, A small secreted protein triggers a TLR2/4-dependent inflammatory response during invasive *Candida albicans* infection, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1015.
- [22] A.L.E. Santos, G.O. Leite, R.F. Carneiro, R.R. Roma, V.F. Santos, M.H.C. Santos, R.O. Pereira, R.C. Silva, C.S. Nagano, A.H. Sampaio, B.A.M. Rocha, P. Delatorre, A.R. Campos, C.S. Teixeira, Purification and biophysical characterization of a mannose/N-acetyl-d-glucosamine-specific lectin from *Machaerium acutifolium* and its effect on inhibition of orofacial pain via TRPV1 receptor, *Arch. Biochem. Biophys.* 664 (2019) 149–156.
- [23] U.K. Laemli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [24] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [25] J. Kuhlman, Drug research: from the idea to the product, *Int. J. Pharmacol. Ther.* 12 (1997) 541–552.
- [26] S. Hunskaar, K. Hole, The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain, *Pain* 30 (1987) 103–114.
- [27] A. Tjølsen, O.G. Berge, S. Hunskaar, J.H. Rosland, K. Hole, *Pain* 51 (1992) 5–17.
- [28] C.A. Winter, E.A. Risley, G.W. Nuss, Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs, *Exp. Biol. Med.* 111 (1962) 544–547.
- [29] S. Wirtz, C. Neufert, B. Weigmann, M.F. Neurath, Chemically induced mouse models of intestinal inflammation, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 541–546.
- [30] F. Hong-bin, L. Ying, B. Ju-ping, Q. Li-ying, C. Jian-qing, Y. Zhi-yong, D. Bin, Investigation on experimental peritonitis mice model induced by glacial acetic acid, *Chin. J. Microecol.* 6 (2007) 6.
- [31] A. Saria, J.M. Lundberg, Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues, *J. Neurosci. Meth.* 8 (1983) 41–49.
- [32] K. Udaqa, Y. Takeuchi, H.Z. Movat, Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability, *Exp. Biol. Med.* 133 (1970) 1384–1387.
- [33] C.C. Winterbourn, M.C. Vissers, A.J. Kettle, Myeloperoxidase, *Curr. Opin. Hematol.* 7 (2000) 53–58.
- [34] K.G. Lalitha, M.G. Sethuraman, Anti-inflammatory activity of roots of *Ecolobium viride* (Forsk) Merrill, *J. Ethnopharmacol.* 128 (2010) 248–250.
- [35] K.F. Swingle, F.E. Shideman, Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory

- agents, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 183 (1972) 226–234.
- [36] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [37] M.V. Ramos, T.B. Grangeiro, B.S. Cavada, I. Shepherd, R.O.M. Lopes, A.H. Sampaio, Carbohydrate/glycan-binding specificity of legume lectins in respect to their proposed biological functions, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 43 (2000) 1–11.
- [38] L.C. Coelho, P.M. Silva, V.L. Lima, E.V. Pontual, P.M. Paiva, T.H. Napoleão, M.T. Correia, Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications, *Evid. Complement. Alternat. Med.* 2017 (2017) 1594074.
- [39] M. Di Rosa, J.P. Giroud, D.A. Willoughby, Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine, *J. Pathol.* 104 (1971) 15–29.
- [40] A.F. Pires, M.M. Bezerra, R.M.F. Amorim, F.L.F. Nascimento, M.M. Marinho, R.M. Moura, M.T.L. Silva, J.L.A. Correia, B.S. Cavada, A.M.S. Assreuya, K.S. Nascimento, Lectin purified from *Lonchocarpus campestris* seeds inhibits inflammatory nociception, *Int. J. Biol. Macromol.* 125 (2019) 53–60.
- [41] R.N. Almeida, D.S. Navarro, J.M. Barbosa-Filho, Plantas com atividade analgésica central, *Phytomedicine* 8 (2001) 310–322.
- [42] J.A. Udobang, P.A. Nwafor, J.E. Okokon, Analgesic and antimalarial activities of crude leaf extract and fractions of *Acalypha wilkensiana*, *J. Ethnopharmacol.* 127 (2010) 373–378.
- [43] R.L.D.C. Rivanor, D.R. Do Val, N.A. Ribeiro, F.D. Silveira, E.L. Assis, Á.X. Franco, L.V. Vieira, I.N.L. Queiroz, H.V. Chaves, M.M. Bezerra, N.M.B. Benevides, A lectin fraction from green seaweed *Caulerpa cupressoides* inhibits inflammatory nociception in the temporomandibular joint of rats dependent from peripheral mechanisms, *Int. J. Biol. Macromol.* 115 (2018) 331–340.
- [44] N.M. Alencar, R.S. Oliveira, J.G. Figueiredo, I.J. Cavalcante, M.P. Matos, F.Q. Cunha, J.V. Nunes, L.R. Bomfim, M.V. Ramos, An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models, *Inflamm. Res.* 59 (2010) 245–254.
- [45] H. Sadeghi, V. Hajhashemi, M. Minaian, A. Movahedian, A. Talebi, A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 667 (2011) 396–401.
- [46] J. Necas, L. Bartosikova, Carrageenan: a review, *Vet. Med.* 58 (2013) 187–205.
- [47] H.K. Solanki, D.A. Shah, P.M. Maheriya, C.A. Patel, Evaluation of anti-inflammatory activity of probiotic on carrageenan-induced paw edema in Wistar rats, *Int. J. Biol. Macromol.* 72 (2015) 1277–1282.
- [48] N.K. Boughton-Smith, A.M. Deakin, R.L. Follenfant, B.J. Whittle, L.G. Garland, Role of oxygen radicals and arachidonic acid metabolites in the reverse passive Arthus reaction and carrageenin paw edema in the rat, *Br. J. Pharmacol.* 110 (1993) 896–902.
- [49] B. Bhukya, R.N.R. Anreddy, C.M. William, K.M. Gottumukkala, Analgesic and anti-inflammatory activities of leaf extract of *Kydia calycina* Roxb Bangladesh, *J. Pharmacol.* 4 (2009) 101–104.
- [50] T.C. Busnardo, C. Padoani, T.C. Mora, M.W. Biavatti, T.S. Fröde, C. Bürger, V.D. Claudino, E.M. Dalmarco, M.M. Souza, Anti-inflammatory evaluation of *Coronopus didymus* in the pleurisy and paw oedema models in mice, *J. Ethnopharmacol.* 128 (2010) 519–525.
- [51] V.L. Campo, D.F. Kawano, D.B. Silva-Jr, I. Carvalho, Carrageenams: biological properties, chemical modifications and structural analyses – a review, *Carbohydr. Polym.* 77 (2009) 167–180.
- [52] Z. Halici, G.O. Dengiz, F.O. dabasoglu, H. Suleyman, E. Cadirci, M. Halici, Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema, *Eur. J. Pharmacol.* 566 (2007) 215–221.
- [53] M. Feldmann, S.R. Maini, Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics, *Immunol. Rev.* 223 (2008) 7–19.
- [54] L. Codarri, A. Fontana, B. Becher, Cytokine networks in multiple sclerosis: lost in translation, *Curr. Opin. Neurol.* 23 (2010) 205–211.
- [55] K.R. Houser, D.K. Johnson, F.T. Ishmael, Anti-inflammatory effects of ethoxyphenolic compounds on human airway cells, *J. Inflamm.* 9 (2012) 1–12.
- [56] D. Dal Secco, J.A. Paron, S.H.P. Oliveira, S.H. Ferreira, J.S. Silva, F.Q. Cunha, Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis, *Nitric Oxide* 9 (2003) 153–164.
- [57] H. Zelová, J. Hošek, TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances, *Inflamm. Res.* 62 (2013) 641–651.
- [58] J.R. Bradley, TNF-mediated inflammatory disease, *J. Pathol.* 214 (2008) 149–160.
- [59] K.N. Couper, D.G. Blount, E.M. Riley, IL-10: The master regulator of immunity to infection, *J. Immunol.* 180 (2008) 5771–5777.
- [60] A. Viola, F. Munari, R. Sánchez-Rodríguez, T. Scolaro, A. Castegna, The metabolic signature of macrophage responses, *Front. Immunol.* 10 (2019) 1–16.
- [61] P. Italiani, D. Boraschi, From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. Functional Differentiation, *Frontiers in immunology* 5 (2014) 514.
- [62] E.R. Sherwood, T. Toliver-Kinsky, Mechanisms of the inflammatory response, *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 18 (2004) 385–405.
- [63] N. Sengar, A. Joshi, S.K. Prasad, S. Hemalatha, Anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic activities of standardized root extract of *Jasminum sambac*, *J. Ethnopharmacol.* 160 (2015) 140–148.
- [64] A. Damre, A. Damre, M. Saraf, Evaluation of sesquiterpene lactone fraction of *Saussurea lappa* on transudative, exudative and proliferative phases of inflammation, *Phytother. Res.* 17 (2003) 722–725.
- [65] S. Verma, S. Ojha, M. Raish, Anti-inflammatory activity of *Aconitum heterophyllum* on cotton pellet-induced granuloma in rats, *J. Med. Plants Res.* 4 (2010) 1566–1569.