

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA – DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**



MIRELA BATISTA COELHO

**Estudo da Atividade inseticida e Pró-inflamatória da Lectina
Isolada de Sementes de *Annona coriacea* Mart.**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>MIRELA BATISTA COELHO</u> <u>[Assinatura]</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de doutor em Biologia
Funcional e Molecular – Área de Bioquímica*

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

**Campinas - SP
2006**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

C55e	<p>Coelho, Mirela Batista Estudo da atividade inseticida e pró-inflamatória da lectina isolada de sementes de <i>Annona coriacea</i> Mart. / Mirela Batista Coelho. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.</p> <p>Orientadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Lectinas. 2. Inseticidas. 3. <i>Annona coriacea</i>. 4. Sementes. I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
-------------	--

Título em inglês: Study of the insecticide and pro-inflammatory activity of lectin isolated from *Annona coriacea* Mart. Seeds.

Palavras-chave em inglês: Lectins, Inseticidas, *Annona coriacea*; Seeds

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo, Valdirene Moreira Gomes, Ladaslav Sodek, José Camillo Novello, Leonilda Maria Barbosa dos Santos.

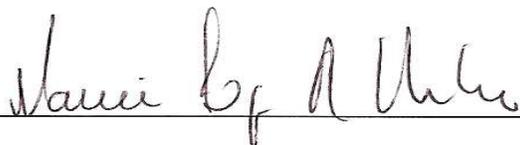
Data da defesa: 07/03/2006.

Campinas, 07 de Março de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Titulares

Profa. Dra. Maria Lígia R. Macedo
(Orientadora)



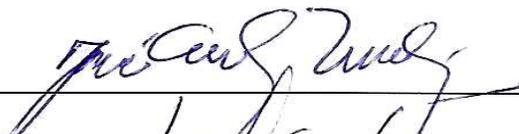
Profa. Dra. Valdirene M. Gomes



Prof. Dr. Ladaslav Sodek



Prof. Dr. José Camillo Novello



Profa. Dra. Leonilda M. B. dos Santos



Suplentes

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Profa. Dra. Maria das Graças M. Freire

Prof. Dr. Paulo Mazzafera

Dedico este trabalho em especial aos meus pais, **Dorival Coelho** e **Edenei B. Coelho** e ao meu noivo **Glauber S. de Araújo...**

...Dedico este trabalho ainda, para as pessoas que fazem sorrir meu coração...

...Para aquelas pessoas que fizeram e as que fazem à diferença na minha vida...

...Para as pessoas que quando olho para trás sinto saudades...

...Para aquelas pessoas que me deram uma força quando eu não estava muito animada para o trabalho...

...Para as pessoas que amo e para as pessoas que um dia amei...

...Para as pessoas que encontro apenas em meus sonhos...

...Para as pessoas que se esqueceram o quanto foram importantes para mim, ou que talvez nunca souberam disso...

...Nossa vida é um caminho cheio de surpresas e incertezas, as quais ninguém é capaz de prever, por isso mais importante do que se tem na vida é quem temos na vida. Todas as pessoas importantes e que fizeram à diferença na minha vida possuem seu lugar no meu coração!!!!

Aprendendo a viver.....

Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança.

E começa a aprender que beijos não são contratos, e que presentes não são promessas. E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança. E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

Depois de um tempo, você aprende que o sol queima, se ficar a ele exposto por muito tempo. E aprende que, não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam...

E aceita que, não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando, e você precisa perdoá-la por isso. Aprende que falar pode aliviar dores emocionais.

Descobre que leva-se anos para construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer, mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem da vida.

E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher. Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam. Percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa - por isso, sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas; pode ser a última vez que as vejamos. Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas que nós somos responsáveis por nós mesmos.

Começa a aprender que não deve se comparar com os outros, mas com o melhor que você pode ser. Descobre que leva muito tempo para se tornar a pessoa que você quer ser, e que o tempo é curto.

Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo; mas que, se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve. Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados.

Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências. Aprende que paciência requer muita prática. Descobre que, algumas vezes, a pessoa que você espera que o chute, quando você cai, é uma das poucas que o ajudam a levantar-se. Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que se aprendeu com elas, do que com quantos aniversários você celebrou.

Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha. Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens poucas coisas são tão humilhantes, e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso. Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não lhe dá o direito de ser cruel.

Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer, não significa que esse alguém não o ame com todas as forças, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso.

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém algumas vezes, você tem que aprender a perdoar a si mesmo. Aprende que, com a mesma severidade com que julga você será em algum momento condenado. Aprende que, não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você junte os seus cacos.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe trouxesse flores. E você aprende que realmente pode suportar... Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe, depois de pensar que não pode mais.

*E que realmente a vida tem valor e que **VOCÊ** tem valor diante da vida !!*

William Shakespeare

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Maria Lígia R. Macedo, por todo o tempo que estive em seu grupo de pesquisa, pelo apoio e compreensão na minha trajetória, pelos pequenos detalhes que demonstram sua presença no trabalho e sua amizade. Agradeço ainda pela sua importante participação no meu processo de maturidade.

Aos Profs. Drs. Sérgio Marangoni e Prof. Edson Antunes, pela gentileza de receber-me em seus laboratórios e pela contribuição importante nos experimentos.

Aos professores Drs. Stephen Hyslop, Carmem Verríssima Ferreira, Sérgio Marangoni, Tomomasa Yano pela participação no exame de qualificação, onde fizeram importantes observações para a revisão dessa tese.

Aos professores Drs. Valdirene M. Gomes, Ladaslav Sodek, Leonilda M. B. dos Santos, José Camillo Novello, Sérgio Marangoni, Maria das Graças M. Freire e Paulo Mazzafera, por participarem da banca examinadora desta tese, valorizando assim o meu trabalho.

À Maria das Graças M. Freire, pelo apoio que me deu na preparação e apresentação final deste trabalho.

A Ivani Aparecida de Souza e Enilton A. Camargo, pela amizade e colaboração nos experimentos de imunologia.

A todos os colegas e o técnico que fazem parte do LAQUIP (Laboratório de Química de Proteínas) pela cumplicidade do dia-a-dia de um laboratório de pesquisa.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções biológicas (LPPFB/UFMS), pela amizade e colaboração, que com certeza foi muito importante para vencer esta etapa.

Agradeço a CAPES, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Agradeço finalmente a Deus que esteve e está em mim a cada segundo de minha existência, nos bons e maus momentos, quando acerto e quando erro!!!!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
I- INTRODUÇÃO.....	1
1 – Aspectos gerais das lectinas de plantas.....	1
1.1 – Classificação das lectinas.....	3
1.2 – Papel fisiológico das lectinas.....	10
2 – Papel das lectinas vegetais na defesa de plantas ao ataque de insetos.....	12
2.1 – Digestão dos insetos.....	13
2.2 – Propriedades inseticidas das lectinas de plantas.....	16
3 – Aplicações das lectinas vegetais na atividade pró-inflamatória.....	19
3.1 – Aspectos gerais do processo inflamatório.....	19
3.2 – Fisiologia das células envolvidas na inflamação.....	21
3.3 – Mediadores químicos dos processos inflamatórios.....	24
3.4 – Lectinas vegetais e eventos imunológicos.....	31
II – OBJETIVOS.....	34
III – MATERIAIS.....	35
1 – Materiais Biológicos.....	35
1.1 – A Planta.....	35
1.2 – Insetos.....	36
1.3 – Camundongos.....	38

2 – Reagentes.....	39
2.1 – Carboidratos e drogas.....	39
IV – MÉTODOS.....	40
1 – Caracterização físico-química de ACLEC.....	40
2 – Estudo da atividade inseticida de ACLEC.....	42
3 – Estudo da atividade pró-inflamatória de ACLEC.....	45
V – RESULTADOS.....	48
1 – Estudo da atividade inseticida de ACLEC.....	48
1.1 – Efeito de ACLEC sobre o desenvolvimento larval de <i>C. cephalonica</i>	48
1.2 – Efeito de ACLEC sobre o desenvolvimento larval de <i>A. kuehniella</i>	55
1.3 – Cromatografia de afinidade em coluna de quitina.....	62
2 – Estudo da atividade pró-inflamatória de ACLEC.....	63
2.1 – Migração de neutrófilos e células mononucleares induzida por ACLEC.....	63
2.2 – Efeito de carboidratos sobre a migração de neutrófilos induzida por ACLEC.....	66
2.3 – Envolvimento de mediadores inflamatórios na migração de neutrófilos induzida por ACLEC.....	67
VI – DISCUSSÃO.....	69
6.1 – Estudo da atividade inseticida de ACLEC.....	69
6.2 – Estudo da atividade pró-inflamatória de ACLEC.....	76
VII – BIBLIOGRAFIA.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de aglutinação por lectinas.....	1
Figura 2: Estrutura e mecanismo de toxicidade das proteínas inativadoras de ribossomos.....	3
Figura 3: Subdivisão das lectinas de plantas de acordo com a característica estrutural.....	4
Figura 4: Ligação da lectina de ervilha a carboidratos.....	8
Figura 5: Diagrama geral do intestino de inseto.....	14
Figura 6: <i>Annona coriacea</i> (Marolo).....	36
Figura 7: Inseto adulto, larva e pulpa de <i>Anagasta kuehneilla</i>	37
Figura 8: Inseto adulto e larva de <i>Corcyra cephalonica</i>	38
Figura 9: Efeito de ACLEC sobre larvas de <i>C. cephalonica</i>	49
Figura 10: Parâmetros fisiológicos medidos para as larvas de <i>C. cephalonica</i>	50
Figura 11: Proteínas totais das fezes e dos intestinos médios das larvas de <i>Corcyra cephalonica</i>	51
Figura 12: Resposta das proteinases de <i>C. cephalonica</i> a ingestão de ACLEC.....	54
Figura 13: Efeito de ACLEC sobre <i>A. kuehniella</i>	56
Figura 14: Parâmetros fisiológicos medidos para as larvas de <i>A. kuehniella</i>	57
Figura 15: Proteínas totais das fezes e dos intestinos médios das larvas de <i>A. kuehniella</i>	58
Figura 16: Resposta das proteinases de <i>A. kuehniella</i> a ingestão de ACLEC.....	61
Figura 17: Cromatografia em coluna de quitina da lectina ACLEC.....	62
Figura 18: Efeito de ACLEC sobre a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal.....	64
Figura 19: Efeito de ACLEC sobre a migração de células mononucleares na cavidade peritoneal.....	65
Figura 20: Efeito inibitório de carboidratos na indução de neutrófilos induzida por ACLEC.....	66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Ocorrência e localização celular das lectinas de plantas.....	5
Tabela 2: Especificidade de ligação a carboidratos de lectinas de plantas.....	9
Tabela 3: Mediadores da inflamação.....	25
Tabela 4: Índices nutricionais para as larvas de <i>C. cephalonica</i>	52
Tabela 5: Índices nutricionais para as larvas de <i>A. kuehniella</i>	59
Tabela 6: Efeito de diferentes agentes farmacológicos no influxo de neutrófilos induzida por ACLEC.....	67

ABREVIATURAS

- AA861** – inibidor de lipoxigenase
- ACLEC** – lectina de *Annona coriacea*
- ASA** – lectina de *Allium sativum*
- CAMs** – moléculas de adesão
- CRD** – domínio de reconhecimento de carboidratos
- Con A** – lectina de *Canavalia ensiformis*
- DAS** – aglutinina de *Diffenbachia sequina*
- EVFA** – lectina de *Erythrina velutina*
- fMLP**–N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
- Gal** – galactose
- GalNAc** – N-acetilgalactosamina
- GlcNAc** –N-acetilglicosamina
- GNA** – lectina de *Galanthus nivalis*
- GSII** – lectina de *Griffonia simplicifolia*
- IFN- γ** – interferon gama
- IL-1** – interleucina 1
- IL-8** – interleucina 8
- IM** – intestino médio
- IP** - inibidores de proteinases
- kDa** – kilodaltons
- KM+** - lectina de *Artocarpus integrifolia*
- KpLec** – lectina de *Koelreuteria paniculata*
- L-NAME** – inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase
- LPS** – lipopolisacarídeo de membrana bacteriana
- LTB₄** – leucotrieno B4
- MAA** – aglutinina de *Maackia amurensis*
- MP** – membrana peritrófica

NeuAc – ácido neuramínico
PAF – fator de ativação plaquetária
PCA4248 – antagonista do receptor do fator de ativação plaquetária
PHA – lectina de *Phaseolus vulgaris*
PNA – lectina de ervilha
RGA – lectina de *Ricinus communis*
sGSII– lectinas de *Griffonia simplicifolia* mutantes
RIP I–proteína inativadora de ribossomos tipo 1
RIP II–proteína inativadora de ribossomos tipo II
SBA – lectina de soja
SDS – dodecil sulfato de sódio
SR140333–antagonista do receptor de neurocinina 1
SR48968–antagonista do receptor de neurocinina 2
TEL – lectina de *Talisia esculenta*
TEMED–N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina
TNF- α – fator de necrose tumoral α
TcLC-I – lectina de Tulipa I
VML – lectina de *Vatairea macrocarpa*
WGA – lectina de *Triticum vulgaris*

RESUMO

As lectinas são um grupo de proteínas e/ou glicoproteínas que se ligam especifica e reversivelmente a carboidratos. Estudos têm demonstrado que essas proteínas possuem importantes atividades biológicas como atividade inseticida contra insetos e respostas imunológicas e fisiológicas em animais. Neste trabalho, tivemos como objetivos comparar os efeitos da lectina de sementes de *Annona coriacea* (ACLEC), com massa molecular de aproximadamente 14 kDa, sobre o desenvolvimento dos lepidópteros *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica* assim como o estudo dos índices nutricionais desses insetos, e investigar a habilidade dessa lectina em induzir a migração de leucócitos em camundongos e os mecanismos farmacológicos delineadores desse processo, utilizando peritonite como modelo experimental.

Os resultados da atividade inseticida de ACLEC mostraram que a lectina não produziu efeitos significativos sobre a sobrevivência e o peso larval de *Corcyra cephalonica* alimentada em dieta contendo até 2,0% de ACLEC, porém, para *Anagasta kuehniella*, em uma dieta artificial contendo 1,5% e 1,0% de ACLEC produziu um LD₅₀ e WD₅₀, respectivamente. Os resultados dos experimentos do consumo alimentar dos insetos apresentaram apenas uma redução na eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e do alimento digerido (ECD) em larvas de *A. kuehniella*. A presença de ACLEC (2,0%) na dieta alimentar em ambos os insetos não modificou a digestibilidade aproximada (AD), mas promoveu um aumento no custo metabólico (CM) e um aumento da atividade proteolítica nas fezes do lepidóptero *A. kuehniella*. Este mecanismo pode promover uma modificação no meio ambiente da membrana e consequente disrupção do mecanismo de reciclagem e de enzimas, indicando a possibilidade de utilizar esta lectina como uma estratégia biotecnológica para o manejo de insetos.

Para a análise da atividade proinflamatória de ACLEC, camundongos Swiss machos foram injetados intraperitonealmente com ACLEC (3-100 µg/cavidade), de 4 a 96 h e logo após a contagem de leucócitos no líquido do lavado peritoneal foi avaliado. ACLEC induziu uma acumulação de neutrófilos dose-dependente, alcançando a resposta máxima a 16 h após a injeção (aproximadamente um aumento de 40x para 30 µg/cavidade). Uma significativa acumulação de células mononucleares foi observada a 72 h (aumento de 2,7x). O carboidrato

manose aboliu o influxo de neutrófilos, porém sacarose e glicose não tiveram efeito. Dexametasona, o inibidor de ciclooxigenase-2 celecoxibe e o antagonista do receptor PAF PCA4248 significativamente reduziram o influxo de neutrófilos induzido por ACLEC. O antagonista de taquicinina NK₁ SR140333, o antagonista de taquicinina NK₂ SR48968, o inibidor não seletivo de NO L-NAME, o inibidor seletivo de NOS Aminoguanidina e o inibidor de lipoxigenase AA861 todos falharam em modificar a resposta induzida por ACLEC. Em conclusão, ACLEC é capaz de atrair neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos por mecanismos envolvendo interações da lectinas com o reconhecimento específico de resíduos de manose presentes nas células, induzindo a liberação de mediadores derivados de COX-2 e PAF.

ABSTRACT

Lectins are a group of proteins and/or glycoproteins, which exhibit specific and reversible carbohydrate-binding activities. Studies have demonstrated that such proteins possess important biological activities including insecticide activity as well as immunological and physiological responses in animals. In this investigation, our aim was to compare the effects of lectin isolated of *Annona coriacea* (ACLEC) seeds, with a molecular mass of 14 kDa, on the development of *Anagasta kuehniella* and *Corcyra cephalonica* Lepidopteras, as well as the study of their nutritional index. Since plant lectins are known to present inflammatory activity, this study also sought to investigate the leukocyte migration induced by ACLEC, and inflammatory mediators involved in this phenomenon.

The results of insecticide activity of ACLEC showed that the lectin did not produce significant effects on survival and weight of *C. cephalonica* on an artificial diet of 2,0% of ACLEC, however, for *A. kuehniella*, on an artificial diet containing 1.5% and 1.0% ACLEC, it produced a LD₅₀ and WD₅₀, respectively. The results from dietary utilization experiments carried out with caterpillars presented only a reduction in efficiency of conversion of ingested food (ECI) and digested food (ECD) in *A. kuehniella*. ACLEC in the diet did not modify the approximate digestibility (AD) of any insect, but an increase of CM (metabolic cost) and an increase of proteolytic activity in the faeces were observed in *A. kuehniella*. These results indicate that ACLEC possesses an insecticide effect only towards *A. kuehniella* larvae, possibly through the binding of lectin on chitin components of membrane peritrophic or glycosylated proteins in the insect midgut. This mechanism can promote a change in membrane environment with the consequent disruption of enzyme recycling mechanisms, indicating the possibility of using this lectin in a biotechnological strategy for insect management.

To test proinflammatory activity of ACLEC, male Swiss mice were intraperitoneally injected with ACLEC (3-100 µg/cavity), and at 4 to 96 h thereafter the leukocyte counts in peritoneal washing fluid were evaluated. ACLEC induced a dose-dependent neutrophil accumulation, reaching maximal responses at 16 h after injection (approximately 40-fold increase for 30 µg/cavity). Significant accumulation of mononuclear cells was observed at 72 h (2.7-fold increase). The carbohydrate mannose nearly abolished the neutrophil influx, whereas

sucrose and glucose had no effect. Dexamethasone, the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib and the PAF receptor antagonist PCA4248 significantly reduced ACLEC-induced neutrophil influx. The tachykinin NK₁ antagonist SR140333, the tachykinin NK₂ antagonist SR48968, the non-selective NO inhibitor L-NAME, the selective inducible NOS inhibitor aminoguanidine and the lipoxygenase inhibitor AA861 all failed to modify the ACLEC-induced responses. In conclusion, ACLEC is able to attract neutrophils into the mice peritoneal cavity by mechanisms involving interactions of the lectin with cell-specific mannose recognition, leading to the release of COX-2-derived mediators and PAF.

I – INTRODUÇÃO

1 – Aspecto Geral das Lectinas de Plantas

Muitas plantas contêm proteínas que se ligam específica e reversivelmente a carboidratos bem definidos. Desde muito tempo, estas proteínas são usualmente referidas como “lectinas” ou “aglutininas” devido a sua habilidade em aglutinar eritrócitos e/ou outros tipos de células animais ou humanas (Figura 1). Embora os termos “lectina” e “aglutinina” sejam ainda amplamente utilizados, poderíamos enfatizar que o termo aglutinação não é mais utilizado como um critério para classificar uma proteína como lectina, devido a muitos agentes serem capazes de causar a aglutinação (Rüdiger, 1998). Com os avanços na biologia molecular em geral e da biologia molecular de plantas em particular, tornou-se apropriado definir as lectinas em termos de domínios de ligação a carboidratos (CRD), e que por essa razão a presença de um ou dois domínios de ligação a carboidratos torne-se um critério para uma dada proteína ser classificada como lectina (Peumans and Van Damme, 1995).

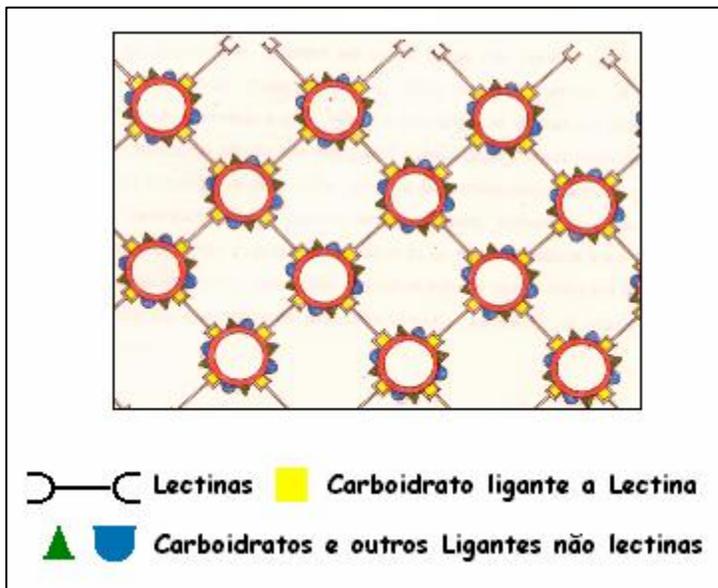


Figura 1: Esquema da aglutinação por lectinas (Adaptação Kennedy et al., 1995).

As lectinas de plantas são também definidas como proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico e que se ligam reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos (Peumans and Van Damme, 1995). Alternativamente, as lectinas também são definidas com proteínas ou glicoproteínas de origem não imune com um ou mais domínios

ligantes por subunidade, os quais podem interagir reversivelmente com açúcares específicos através de pontes de hidrogênio e interações de Van Der Waals (Lis et al., 1998).

Rüdiger (1998), também apontou alguns requisitos para que uma proteína seja denominada lectina, como: a) ser uma proteína ou glicoproteína que se liga a carboidrato e conseqüentemente aglutina hemácias e outras células que possuam um ou mais domínios de ligação para carboidrato; b) ligar-se a carboidratos, não necessariamente ser glicosilada; c) ser produzida constitutivamente ou induzida através de estímulos externos (Van Damme et al., 2004).

As lectinas de plantas não necessariamente possuem apenas domínios ligantes de carboidratos, mas também podem apresentar um domínio não relacionado, com estrutura e atividade biológicas totalmente diferentes. Evidentemente, esta abordagem na definição de lectinas acarreta conseqüências para seus estudos funcionais, já que o papel fisiológico de algumas dessas proteínas depende de dois ou mais domínios com uma atividade biológica totalmente diferente e em alguns casos, a função chave da lectina pode ser determinada por um domínio diferente de CRD (Van Damme et al., 2004).

Podemos destacar como exemplo, a lectina de plantas ricina (Figura 2), obtida de sementes de *Ricinus communis*. A ricina foi uma das primeiras lectinas de plantas a ser estudada. É uma lectina tóxica, possuidora de uma cadeia B (32 kDa) ligante de Gal/GalNAc, e uma outra denominada cadeia A (30 kDa), uma subunidade tóxica, conectada por pontes dissulfeto. A cadeia A tem uma atividade RNA N-glicosidase para a clivagem específica de uma base adenina do RNA ribossomal com a função de inibir a síntese de proteína. A cadeia B possui um papel importante de ligação para os glicoconjugados da superfície celular das células alvo e facilitar a internalização e translocação da toxina para o citoplasma. A ricina pertence ao grupo de proteínas inativadoras de ribossomos do Tipo 2 (RIP-2), que são distintas das RIP-1 pela presença da cadeia B. O grupo do RIP-1 é menos citotóxico devido à falta da cadeia B (Lorde t al., 1994).

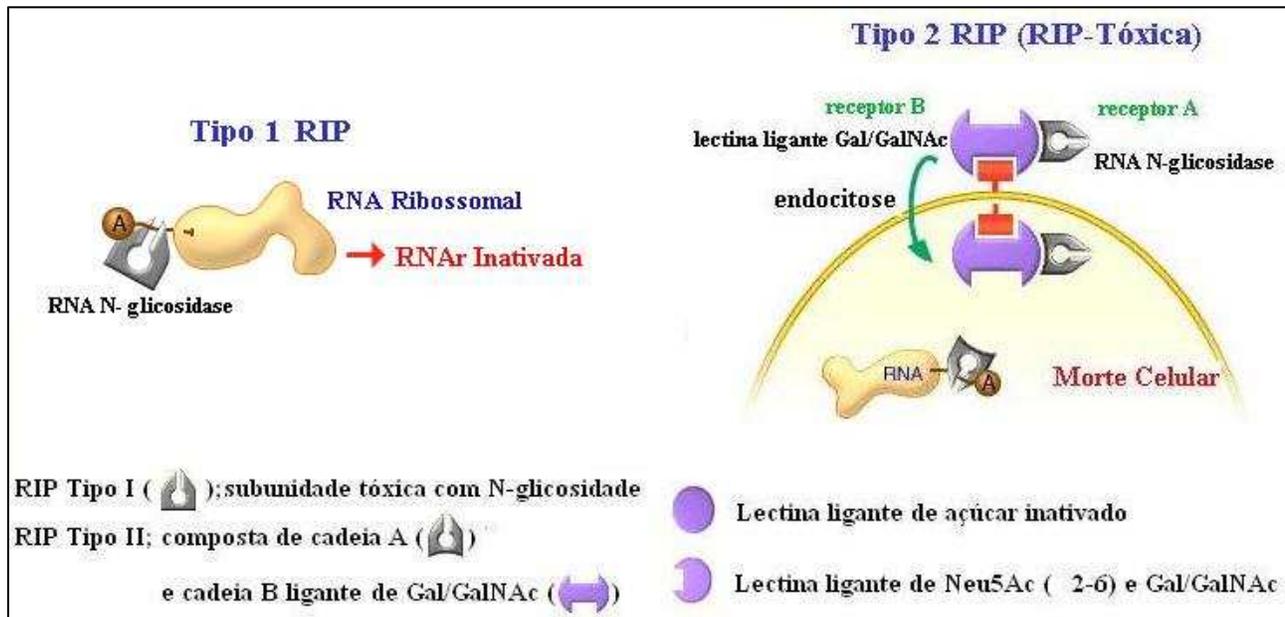


Figura 2: Estrutura e mecanismo de toxicidade das proteínas inativadoras de ribossomo o Tipo I e II (Adaptado www.gak.co.jp/FCCA/glycoword).

1.1 – Classificação das lectinas

1.1.1 – Classificação Estrutural

Devido a essas novas definições e estruturas, as lectinas de plantas são subdivididas em quatro classes: mero, holo, quimero e superlectinas (Peumans et al., 1998; Van Damme et al., 1998) (**Figura 3**).

- Merolectinas: proteínas que têm pelo menos um domínio ligante de carboidrato. São monovalentes e conseqüentemente incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Ex.: heveína proteína do látex ligante de quitina (*Hevea brasiliensis*).

- Hololectinas: compreende todas as lectinas que possuam domínios di- ou multivalente idênticos ou muito similares. A maioria das lectinas vegetais pertence ao grupo as hololectinas como exemplo Con A (concanavalina A) (Peumans et al., 1998).

- Quimerolectinas/Hemilectinas: são proteínas que consistem de um ou mais domínios ligantes de carboidratos mais um domínio distinto com atividade catalítica ou com outra atividade biológica. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas comportam-se como merolectinas ou como hololectina, um exemplo é a ricina (toxina da mamona) (Peumans et al., 1998).

- Superlectinas: também possuem pelo menos dois domínios ligantes de carboidratos, mas difere das hololectinas devido seus domínios serem capazes de reconhecer açúcares estruturalmente não relacionados. Um exemplo é a lectina de Tulipa (TcLC-I) que possui um domínio manose e um não relacionado de ligação a N-acetilgalactosmina (Van Damme et al., 1996).

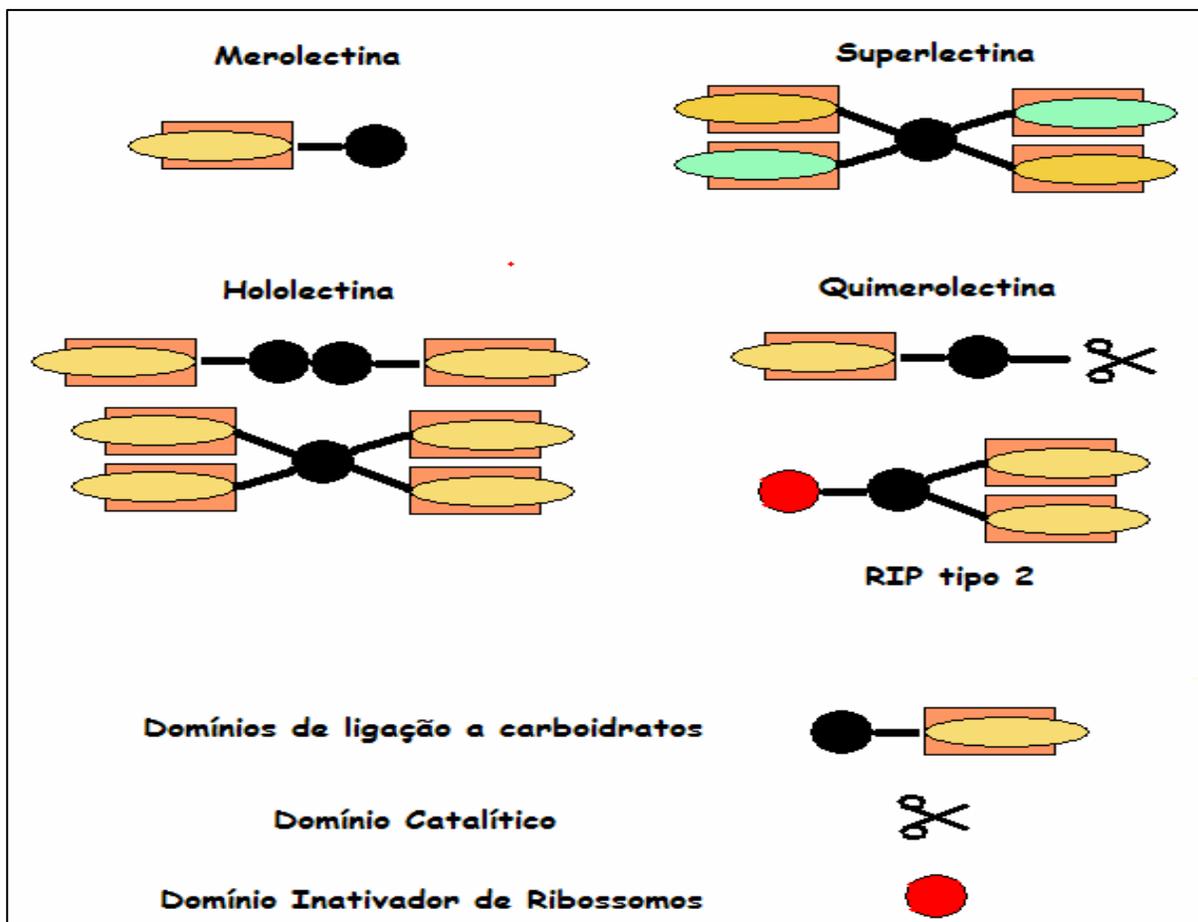


Figura 3: Subdivisão de lectinas de plantas de acordo com a característica estrutural (Adaptação de Van Damme et al., 1998).

1.1.2 – Ocorrência e estrutura molecular

As lectinas de plantas não representam uma única superfamília de proteínas de plantas, mas definitivamente exibem uma marcada diversidade estrutural. Detalhes bioquímico e estrutural e análises molecular mostram evidências muito fortes que virtualmente todas as lectinas de plantas conhecidas podem ser classificadas em apenas 7 famílias de proteínas estruturalmente e evolucionariamente relacionadas (Tabela 1).

Tabela 1: Ocorrência e localização celular das lectina de plantas^a.

FAMÍLIA DE LECTINAS		OCORRÊNCIA	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR
Amarantinas		Presente apenas no gênero <i>Amaranthus</i>	Proteínas citoplasmáticas
Lectinas ligantes de Quitina (domínio Heveína)		Presente em plantas	Algumas localizadas no vacúolo, outras são secretadas no espaço extracelular
Lectinas do Floema de Cucurbitaceae	<i>Lectinas Clássicas do Floema</i>	Apenas Família Cucurbitaceae	Citoplasma
Lectinas relacionadas à Jacalina	<i>Subgrupo Galactose específica</i>	Apenas Família Moraceae	Vacúolo
	<i>Subgrupo Manose específica</i>	Comum em todos os grandes grupos taxonômicos	Citoplasma (núcleo)
Lectinas de Legumes		Documentadas em Fabaceae e Laminaceae	Vacúolo
Lectinas de Monocotiledôneas ligantes de manose		Documentadas em 8 famílias de monocotiledôneas e 3 famílias de dicotiledôneas	Vacúolo
Proteínas inativadoras de Ribossomo Tipo 2		Documentadas em >10 famílias de plantas de todos os maiores grupos taxonômicos	Vacúolo

^a Adaptada de Van Damme et al. (2004).

Esta classificação das lectinas em diferentes famílias é baseada na similaridade seqüencial e no relacionamento estrutural entre as lectinas. Não podemos excluir que pouquíssimas lectinas ainda não classificadas pertencem a famílias de proteínas diferentes e com isso é bem possível que novas famílias de lectinas sejam descobertas no futuro (Van Damme et al., 2004).

Geralmente, as lectinas estão distribuídas por toda parte da planta. A maior parte, porém, encontra-se nos órgãos de armazenamento. Outras partes da plantas tal como folhas, caule, raízes ou flores principalmente, contêm apenas pequenas quantidades as quais não são necessariamente idênticas na estrutura ou especificidade a carboidratos, como as lectinas dos órgãos de armazenamento (Rüdiger, 1998).

A localização intracelular das lectinas tem sido discutida há muitos anos. E hoje é certo que a maioria das lectinas típicas que ocorrem em órgãos de armazenagem esteja localizada em organelas celulares especiais que são produzidas a partir de vacúolos e são denominadas de corpos protéicos (Rüdiger, 1998).

As lectinas são sintetizadas na forma de pró-proteínas no retículo endoplasmático, e após sofrerem processamentos co e/ou pós-traducionais originam a proteína madura. Esse processamento envolve: remoção de um peptídeo sinal de 20-30 aminoácidos, clivagem proteolítica da cadeia precursora, perda da extremidade C-terminal, remoção de carboidrato estrutural e a ligação das extremidades C- e N-terminal originais (Loris et al., 1998). Durante ou após o transporte da lectina até os vacúolos de armazenamento, via complexo de Golgi, podem ocorrer modificações pós-transducionais nas unidades de carboidratos, ocasionando perdas dessas moléculas. Frequentemente, essas modificações geram cadeias polipeptídicas. Nesses polipeptídeos a seqüência sinal da extremidade N-terminal é composta de 29 resíduos, seguidos da cadeia β e logo depois da cadeia α . A clivagem da ligação entre a cadeia β e α , originando a lectina madura, acontece nos corpos protéicos, local do último estágio da biossíntese da lectina (Sharon et al., 1990). Embora a localização nos corpos protéicos seja característica para a maioria das lectinas conhecidas, há exceções, como exemplo, algumas Leguminosas como *Datura stramonium* e *Artocarpus integrifolia*, as quais são encontradas associadas à parede celular (Rüdiger, 1998).

1.1.3 – Especificidade das lectinas de plantas para ligação a carboidratos

As lectinas distinguem-se de todas as outras proteínas de plantas por sua capacidade de ligar-se a carboidratos simples ou complexos. Alguns aspectos importantes têm sido descritos com respeito à essa especificidade (Peumans et al., 1998).

- a) As lectinas de plantas exibem uma ampla gama de interações;
- b) A maioria das lectinas tem mais afinidade por oligossacarídeos do que por açúcares simples;
- c) Lectinas estruturalmente diferentes podem reconhecer os mesmos açúcares,
- d) A especificidade de muitas lectinas ocorre com glicanos não originados de plantas.

A capacidade de aglutinar células, isoladamente, não é característica de uma lectina, pois outros agentes, como taninos, certos lipídeos e cátions divalentes em altas concentrações também são capazes de produzir esse tipo de reação. Para garantir que a aglutinação esteja sendo mediada pela lectina exige-se que ocorra a inibição desta atividade por carboidratos. O inverso da menor concentração e carboidrato que inibe a aglutinação oferece uma estimativa da afinidade entre o carboidrato e a lectina (Rüdiger, 1998).

As várias atividades biológicas das lectinas têm sido descritas todas com relação a uma única propriedade: a habilidade em ligar-se a carboidratos. Cada molécula de lectina tem dois ou mais CRDs, os quais uma ou mais moléculas de carboidrato se ajustam. Como ilustrado na Figura 4, a ligação da lectina de ervilha envolve dois monossacarídeos, com um arranjo espacial próprio. Por vezes a parte protéica ou lipídica da glicoproteína ou da lipoproteína também interage com a lectina através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas que não estão localizadas nos sítios de ligação a carboidrato, mas que desempenham papel fundamental na interação da lectina com estruturas tissulares (Sharon, 1977; Rüdiger, 1998).

O complexo proteína-carboidrato envolve o estabelecimento de novas pontes de hidrogênio; estas pontes e as interações de Van der Waals são as forças predominantes na estabilidade da ligação (Rüdiger, 1998).

As lectinas de plantas também são subdivididas em 5 grupos, de acordo com os monossacarídeos pelos quais elas exibem maior afinidade. Assim, dependendo da especificidade para um dado monossacarídeo, a lectina se ligará seletivamente a um desses açúcares os quais são constituintes típicos das superfícies celulares de eucariotos (Tabela 2).

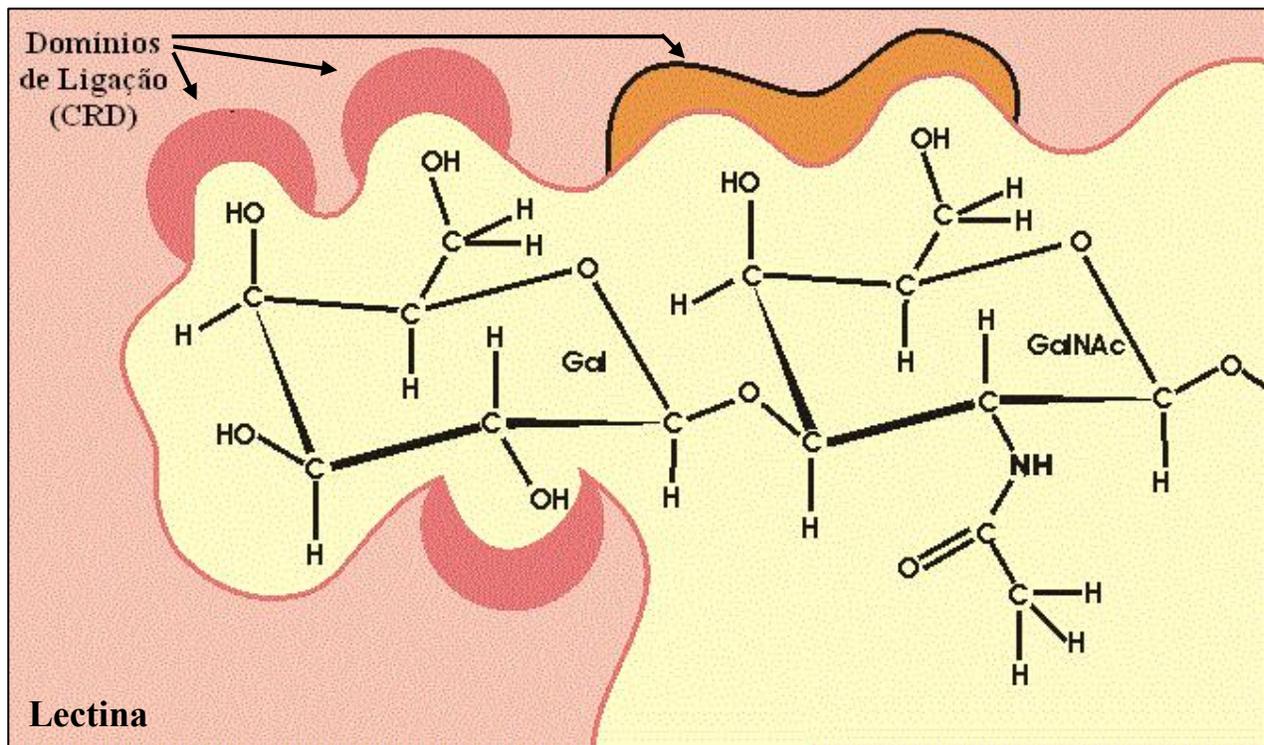


Figura 4: Ligação da lectina de ervilha a carboidratos (Sharon, 1977).

Considerando as diferenças na estrutura e na especificidade de ligação a carboidratos entre as famílias de lectina, é provável que todas as lectinas tenham funções idênticas. A atividade de ligação a carboidrato e a especificidade são fatores determinantes nas funções normais das lectinas. Além disso, pode ser esperado que a ligação específica da lectina ao seu receptor glicoconjugado seja um passo essencial na ação das lectinas (Peumans and Van Damme, 1998).

Tabela 2: Especificidade de ligação a carboidratos de lectinas de plantas^a

<i>ESPECIFICIDADE</i>	<i>LECTINAS</i>
Grupo Fucose	
Fucose	<i>Ulex europeus</i>
Grupo Galactose; N-acetilgalactosamina	
Galactose » GalNAc	<i>Artocarpus integrifolia</i> (Jacalina)
Gal = GalNAc	<i>Clerodendron trichotomum</i>
Gal « GalNAc	<i>Glycine max</i> (Soja)
Grupo N-acetilglicosamina	
GlcNAc	<i>Triticum aestivum</i> (Germe de trigo)
(GlcNAc) _n	<i>Urtica dioica</i> (UDA)
Grupo Manose	
Manose	<i>Galanthus nivalis</i> (GNA)
Manose/Glicose	<i>Canavalia ensiformes</i> (Con A)
Manose/Maltose	<i>Calystegia sepium</i>
Grupo Ácido Siálico	
Ácido siálico	<i>Triticum aestivum</i> (WGA)
Neu5Ac α (2,6)Gal/GalNAc	<i>Sambucus nigra</i>
Neu5Ac α (2,3)Gal/GalNAc	<i>Maackia nigra</i>
Grupo de Glicanos Complexos	
Especificidade com complexos conhecidos	<i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA)
Especificidade com complexos desconhecidos	<i>Euonymus europaeus</i>

^a Peumans et al., 1998.

1.2 – Papel Fisiológico das Lectinas de Plantas

O possível papel fisiológico das lectinas tem intrigado muitos pesquisadores. Especula-se que as lectinas possuam função como anticorpos para proteger as plantas contra bactérias do solo, controle da germinação das sementes, ou estarem envolvidas no transporte e armazenagem de açúcares (Sharon and Lis, 2004).

A proposta que as lectinas podem estar envolvidas na proteção das plantas contra microorganismos, foi baseada em observações com experimentos utilizando lectinas, tais como: TEL (lectina de *Talisia esculenta*) que inibe o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* (Freire et al., 2002); Labramin (lectina de *Labramia bojeri*) que inibe o crescimento do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Macedo et al. 2004a), e as lectinas do gênero *Artocarpus* (*A.integrifolia* e *A. incisa*) as quais inibem o crescimento de *Fusarium moniliforme* e *Saccharomyces cerevisiae* (Trindade et al., 2006).

Recentemente, Van Damme e colaboradores (2004) têm questionado que apesar da ausência de um sistema imunológico e devido às células vegetais estarem recobertas por uma parede celular possivelmente explica o porquê que as interações célula-célula mediadas por lectinas são muito menos importantes nas plantas do que nos animais. Por essa razão, parece provável que em plantas, as interações proteína-carboidrato fisiologicamente importantes estão confinadas ao compartimento citoplasmático e/ou nuclear. Além disso, uma apropriada localização de uma lectina deve também ter uma especificidade certa para interagir com glicoconjugados endógenos. Pouco é conhecido sobre os glicanos encontrados no citoplasma e núcleo das células vegetais, o critério de especificidade pode apenas ser aplicado para excluir aquelas lectinas que se ligam exclusivamente a açúcares ausentes das plantas (tais como ácido siálico e N-acetilgalactosamina). As lectinas de plantas com um papel endógeno específico estão – como as lectinas animais – provavelmente presentes em pequenas quantidades, ou pelo menos em concentrações que estejam na mesma ordem de magnitude como os seus potenciais alvos. Além do mais, há uma razoável possibilidade que estas lectinas não sejam constitutivamente expressas em toda a planta (ou apenas em baixos níveis), mas são

sintetizadas em resposta a alguns estímulos endógenos ou exógenos e apenas em alguns tecidos ou células que respondam ao tratamento (Van Damme et al., 2004).

A primeira evidência de uma lectina de planta com um papel endógeno foi determinada da proteína codificada pelo gene *SALT* de arroz (gene de arroz sal-induzido) denominada *Oryzata* (Claes et al., 1990; Zhang et al., 2000), como uma lectina citoplasmática ligante de manose. Esta lectina não pode ser encontrada em plantas não tratadas, mas é detectada em raízes e membrana cilíndrica que circunda o tronco (mas não na lâmina) após a planta intacta seja submetida ao estresse de sal ou seca, ou até mesma tratada com ácido jasmônico e ácido abscísico (Van Damme et al., 2004). Em adição para com os cereais, o ácido jasmônico induz lectinas relacionadas a jacalina manose específicas em calos de plantas de *Helianthus tuberosus* (Nakagawa et al., 2000) e em *Ipomoea batatas* (Imanishi et al., 1997).

Desse modo, podemos fazer uma comparação entre as lectinas com um presumível papel endógeno e com um papel de armazenamento e/ou defesa. As lectinas com um provável papel endógeno têm uma estrutura mais simplificada indicando que a maioria das lectinas relacionadas com a defesa e/ou armazenamento são mais complexas, e provavelmente evoluíram de formas citoplasmáticas menos complexas. Isto sugere que as plantas desenvolveram domínios de ligação a carboidratos para as funções endógenas específicas e apenas os estágios mais tardios utilizaram os genes correspondentes como modelo para o desenvolvimento de lectinas com um papel relacionado à defesa e/ou armazenamento (Van Damme et al., 2004).

Tanto a especificidade quanto os efeitos deletérios das lectinas de plantas a insetos e/ou a animais superiores indicam que elas desempenham um papel de proteção, de modo que a reação de fuga desses predadores possa ser benéfica para a sobrevivência das espécies (Peumans and Van Damme, 1995).

2 - O Papel das Lectinas Vegetais na Defesa de Plantas ao Ataque de Insetos

Concomitante a explosão populacional nos países mais pobres e a redução de propriedades para a produção de colheitas, há uma tendência para a substituição das proteínas animais pelas proteínas vegetais na alimentação, as quais têm um melhor custo e eficiência. O aproveitamento da agricultura é reduzido com perdas tão altas quanto 45%, antes ou após a colheita, devido ao ataque de pestes variadas, incluindo insetos, nematóides, doenças relacionadas a vírus ou bactérias. Estima-se que essas perdas estejam em torno de 100 bilhões de dólares anualmente. O maior dano é causado pelos artrópodes e os métodos utilizados hoje para a proteção das colheitas contra a predação por insetos são altamente dependentes de substâncias químicas agressivas ao meio ambiente. Este fato justifica a necessidade de pesquisas e o desenvolvimento de alternativas para este problema (Sharma et al., 2000).

A evolução das plantas transformou o ambiente terrestre num dos recursos mais valiosos para a comunidade herbívora. Nos ecossistemas naturais, as plantas e os insetos são apenas alguns dos organismos vivos que estão intimamente associados: os insetos têm várias atividades benéficas incluindo a defesa e a polinização enquanto as plantas provêm à proteção, sítios para ovoposição e alimento (Mello e Silva-Filho, 2002).

A interação planta-inseto é um sistema dinâmico, sujeito as contínuas variações e mudanças. Para reduzir o ataque de insetos, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa incluindo barreiras químicas como proteínas defensivas (Haruta et al., 2001) – lectinas e inibidores de proteases: substâncias voláteis para a atração de predadores de insetos herbívoros e metabólitos secundários (Mello e Silva-Filho, 2002). Em paralelo, os insetos desenvolveram estratégias para sobrepujarem as barreiras das plantas tais como a detoxificação de compostos nocivos para eles, mecanismo de escape, seqüestro de produtos tóxicos (Nishida, 2002) e alteração de modelos de expressão de genes (Silva et al., 2001).

As plantas têm evoluído, sofisticadamente, muitos mecanismos de defesa os quais estão concentrados nas sementes já que estes são os veículos para a propagação e sobrevivência das espécies. Os tecidos das sementes podem acumular constitutivamente ou após a indução, um

amplo conjunto de compostos que conferem resistência contra predadores e a infecção por vírus, bactérias, fungos e nematóides.

As plantas produzem substâncias químicas com a finalidade de defesa, de duas maneiras, primeiro, como substâncias constitutivas para repelir os insetos através das plantas e em segundo, como substâncias induzidas em resposta aos danos teciduais causados pelos insetos. Estas estratégias são capazes de prevenir muitos danos causados por insetos embora haja um número reduzido de insetos que são capazes de adaptar-se a determinadas espécies de plantas (Mello e Silva-Filho, 2002).

A síntese e o acúmulo de uma variedade de proteínas de reserva têm sido relacionados como proteínas de defesas desde que estas proteínas apresentem propriedades entomotóxicas tais como inibidores de proteinases (Garcia et al., 2004; Macedo et al., 2003), lectinas (Macedo et al., 2004), inibidores de α -amilase (Franco et al., 2002), proteínas inativadoras de ribossomos (RIP's) do tipo 1 e 2, inibidores de enzimas proteolíticas e glicohidrolases (Peumans et al., 1995), canatoxina (Carlini et al., 1997). Estas proteínas estão comumente nas sementes e órgãos de plantas leguminosas (Sales et al., 2000; Franco et al., 2002).

2.1 – Digestão dos Insetos

De acordo com o diagrama geral do canal alimentar de um inseto (Figura 5) proposto por Terra e Ferreira (1994), o intestino anterior (IA) é constituído pela boca onde encontramos as glândulas salivares, faringe, esôfago e o papo. O proventrículo é um órgão de trituração dos insetos e em muitos deles, atua como uma válvula que controla a entrada do alimento na porção do intestino médio, principal local da digestão e absorção de nutrientes.

O intestino médio (IM) consiste de um tubo simples (ventrículo) que pode sofrer ramificações, dando origem ao ceco gástrico. Na maioria dos insetos, o intestino médio é revestido por uma estrutura quitinosa, a membrana peritrófica, que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço ectoperitrófico. Na região do esfíncter, separando o intestino médio do posterior, os órgãos de excreção que se ramificam lateralmente são os túbulos de

Malpighi. O intestino posterior (IP) inclui o íleo e o reto, envolvidos na absorção de água e íons, terminando no ânus.

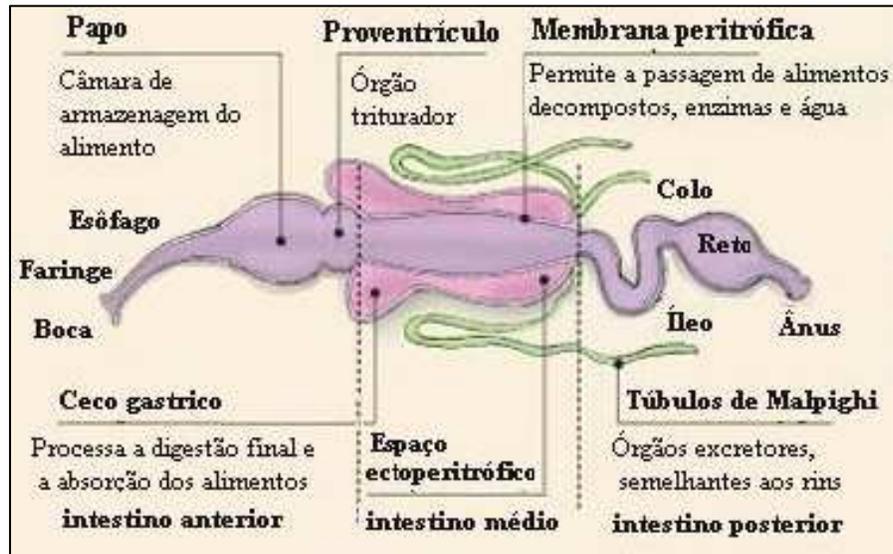


Figura 5: Diagrama geral do intestino de inseto (adaptado por Terra e Ferreira, 1994).

2.1.1 – Membrana Peritrófica (MP)

A membrana peritrófica é um finíssimo envelope membranoso que recobre o bolo alimentar no intestino dos membros da maioria dos filos animais, incluindo o dos insetos. Ela está organizada num arranjo de quitina (4-13%) em uma matriz de proteína (21-51%) e carboidrato (Richards et al., 1997). Poucas ordens não possuem esta membrana e muitas vezes sua presença está associada com a idade do inseto como nos Siphonaptera, onde sua ocorrência é apenas no estágio larval (Peters, 1992).

As proteínas estruturais da MP estão principalmente associadas com as fibras de quitina por ligações não covalentes via os domínios de ligação a quitina. A presença de múltiplos domínios ligantes de quitina nas proteínas da MP torna possível a formação de uma estrutura membranosa semelhante a um gel sustentado pelas fibras de quitina (Wang et al., 2001).

A forte ligação das proteínas de membrana à quitina pode também proteger as proteínas e a quitina da degradação pelas enzimas do intestino médio tanto endógenas quanto obtidas do material alimentar. Os domínios ligantes de quitina são ricos em cisteína e a presença de ligações dissulfeto contribui para a estabilidade (Wang et al., 2001).

Dentre as principais funções atribuídas a esta estrutura estão a proteção mecânica contra a injúria às células do IM; barreira física contra microorganismos; barreira de seletividade para as enzimas digestivas e produtos da digestão; e atuação no mecanismo e conservação das enzimas digestivas (Terra, 2001).

2.1.2 – Proteinases de Insetos

A compartimentalização das enzimas é outra propriedade importante da membrana peritrófica. As enzimas envolvidas na digestão inicial são encontradas no espaço endoperitrófico que está envolvido pela membrana peritrófica, cuja capacidade em compartimentalizar as enzimas digestivas depende de sua permeabilidade (Terra et al., 1994). A integridade desta membrana quando afetada, pode interferir no processo de digestão e absorção de nutrientes e, conseqüentemente, pode causar danos no desenvolvimento do inseto (Habibi et al., 2000; Paes et al., 2000).

As proteases digestivas têm como finalidade catalisar a liberação de peptídeos e aminoácidos oriundos das proteínas ingeridas e são abundantemente encontradas na região do intestino médio do trato digestivo de insetos. As proteases estão subdivididas em endopeptidases, que clivam cadeias protéicas em lugares específicos e exopeptidases que removem aminoácidos da região C-terminal ou N-terminal (Jongsma et al., 1997).

A maioria dos estudos sobre os processos digestivos em insetos sugere que eles poderiam ser agrupados com o tipo de dieta ingerida. Esta hipótese é devida à ocorrência de diferentes proteinases digestivas no canal alimentar que dependem principalmente da composição química da dieta ingerida (Terra e Ferreira, 1994).

Dentre as ordens de insetos já estudadas, os lepidópteros e dípteros utilizam principalmente serinoproteinases para a digestão de proteínas. Eles têm o intestino médio alcalino que, dependendo das espécies apresentam pH ótimo entre 8 e 11,5 para a atividade dessa classe de proteínas. Estudos mais recentes têm mostrado que outras classes de proteinases também são encontradas nos intestinos desses insetos (Terra e Ferreira, 1994; Jongsma et al., 1997). Nestas incluem-se proteinases cisteínicas (tiol) e aspárticas (carboxil) com resíduos de cisteína e aspartato nos sítios ativos, respectivamente, tanto quanto as metaloproteinases e aminopeptidases. Muitos coleópteros apresentam cisteinoproteinases ativas em pH levemente ácido (5-7). As proteinases aspárticas, que são encontradas em combinação com outras proteinases, são ativas no pH ácido, usualmente abaixo de 4,5 (Jongsma et al., 1997).

2.2 – Propriedades inseticidas das lectinas de plantas

Já é conhecida a atividade inseticida das lectinas de plantas contra as diversas espécies de insetos de diferentes ordens tais como Coleóptera, Díptera, Homóptera e Lepidoptera (Carlini et al., 2002). Esta característica representa um potencial uso das lectinas de plantas como agentes inseticidas obtidos naturalmente contra as pragas que impedem o crescimento da produção agrícola. Geralmente os bioensaios *in vitro* tentam avaliar esta característica biológica. Estes consistem na inclusão de lectinas já estudadas, em dietas artificiais que em seguida, são oferecidas ao inseto alvo durante um determinado período. Em geral, o nível de lectina incorporada nas dietas artificiais, para testar a toxicidade oral, varia de 1 a 50 mg de proteína/g de dieta ou de 5 a 1500 µg/ml de dieta para insetos mastigadores ou sugadores, respectivamente. Os parâmetros que indicam os efeitos danosos das lectinas aos insetos incluem: peso larval, tamanho, coloração, mortalidade, inibição da alimentação, efeitos antimetabólicos, nível de excreção, pulpação, atraso no tempo total de desenvolvimento, emergência e/ou fecundidade dos adultos na primeira e segunda geração dos insetos que tenham sido alimentados com as dietas contendo lectinas (Vasconcelos e Oliveira, 2004).

Embora o modo exato de ação inseticida das lectinas de plantas não esteja completamente elucidado, parece que a resistência à degradação proteolítica pelas enzimas

digestivas do inseto e a ligação às estruturas do intestino do inseto sejam os dois pré-requisitos básicos para as lectinas exercerem seus efeitos deletérios nos insetos. Como nos sistemas de animais superiores, os efeitos nocivos das lectinas nos insetos são atribuídos principalmente à ligação destas à superfície das células epiteliais do intestino que induz interferências nas funções digestivas, protetoras ou secretórias do intestino (Pusztai, 1996).

No entanto, é óbvio que para que ocorra a ligação às estruturas do intestino, células /ou qualquer enzima digestiva ou outro componente do inseto, as lectinas administradas oralmente têm que primeiramente ser refratárias a ação das enzimas proteolíticas e, também contar com o ambiente satisfatório de pH e temperatura, para exercer seus efeitos.

A análise da estrutura/função pela metagênese sítio-dirigida indicou que a atividade inseticida e de ligação da lectina específica de *Griffonia simplicifolia* (GSII) e suas formas mutantes estavam correlacionadas com a resistência à degradação proteolítica pelas enzimas do intestino médio e ligação ao trato digestivo de larvas do terceiro e quarto instar de *Callosobruchus maculatus* (Coleóptera). Este inseto quando alimentado com dieta artificial contendo GSII teve inibição do crescimento e um tempo de desenvolvimento prolongado. Estes efeitos podem ser resultados da ligação desta lectina a quitina da membrana peritrófica (Zhu-Salzman et al., 1998).

Duas lectinas ligante de quitina, TEL e KpLec, de sementes de *Talisia esculenta* e *Koelreuteria paniculata* respectivamente, afetaram negativamente o desenvolvimento dos insetos *Callosobruchus maculatus* e *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Macedo et al., 2002, 2003). A análise de regressão indicou que para cada aumento de 0,1% na dose de TEL oferecida na dieta artificial havia um aumento de 3,9% ($R^2=0,98$) e 4,1% ($R^2=0,99$) na mortalidade dos insetos *C. maculatus* e *A. kuehniella*, respectivamente (Macedo et al, 2002), enquanto que para cada 0,1% de aumento na dose de KpLec havia um aumento da mortalidade de 5,9% ($R^2=0,98$) e 5,3% ($R^2=0,96$) dos insetos *C. maculatus* e *A. kuehniella*, respectivamente.

Alguns estudos realizados para elucidar o mecanismo de ação da lectina GNA (*Galanthus nivalis* – específica a manose) sobre o inseto *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) mostrou que nenhuma degradação proteolítica significativa ocorreu tanto no

intestino como no honeydew dos insetos alimentados com a dieta artificial (Powell et al., 1998). GNA foi capaz de ligar-se à superfície luminal do epitélio celular do intestino médio desse mesmo inseto, provavelmente reconhecendo carboidratos presentes na superfície celular, glicoproteínas e/ou outros glicoconjugados no intestino. Além disso, os estudos indicam que GNA estava presente nos corpos gordurosos, ovariolos, e na hemolinfa, sugerindo que GNA foi capaz de ultrapassar a barreira do epitélio do intestino médio e passar para o sistema circulatório do inseto resultando num efeito tóxico sistêmico (Powell et al., 1998).

GNA e Con A (lectina de *Canavalia ensiformis*) quando incluídas em dietas artificiais e oferecidas às larvas do lepidóptero *Lacanobia oleraceae* acumularam-se no intestino, túbulos de Malpighi e hemolinfa indicando que ambas as lectinas foram internalizadas e distribuídas sistemicamente após a ligação às glicoproteínas presentes ao longo do trato digestivo do inseto (Fitches et al., 2001). Uma dose tóxica de GNA foi também capaz de induzir mudanças morfológicas na região do intestino médio das larvas de *N. lugens* com disrupção da região das microvilosidades (Powell et al., 1998).

Outros efeitos antinutricionais para os insetos alimentados com dietas artificiais contendo lectina de plantas é a possibilidade que as lectinas podem desestabilizar o metabolismo do inseto interferindo com as funções enzimáticas tanto indiretamente quanto pela ligação às enzimas digestivas glicosiladas do intestino (Van Damme et al., 1998). GNA e Con A administradas oralmente afetaram as atividades das enzimas solúveis e membrana do intestino médio das larvas de *Lacanobia oleraceae*. Além disso, ocorreu o aumento da atividade total da enzima aminopeptidase e induziram um significativo aumento na atividade da α -glicosidase. Lectinas que se ligam às células epiteliais podem indiretamente afetar o mecanismo regulatório das enzimas e como consequência perturbar a síntese da matriz peritrófica (Fitches e Gatehouse, 1998).

3 – APLICAÇÕES DAS LECTINAS VEGETAIS NA ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA

3.1 – Aspectos gerais do processo inflamatório

O fenômeno inflamação pode ser compreendido como reações coordenadas de algumas funções do organismo contra lesões provocadas por agentes físicos, químicos ou biológicos, caracterizado por reações que dependem da natureza do agente agressivo e extensivamente da maneira como o organismo pode mobilizar seus recursos defensivos (Rocha e Silva, 1978). É uma complexa cadeia de eventos que está envolvida nos processos de reparação e defesa, como também em doenças auto-imune e câncer.

A inflamação possui como sinais clínicos: calor, tumor, rubor, dor e perda de função (Robbins et al., 1996), sendo dividida em uma fase aguda e uma fase crônica. A primeira das da reação inflamatória – fase aguda – depende de o estímulo ser ou não persistente, esta reação pode tornar-se crônica, podendo, muitas vezes, ser prejudicial ao organismo. Frequentemente, após a fase aguda, ocorre a resolução do processo, em razão da eliminação dos agentes causadores (Sedgwick e Willoughby, 1985).

A inflamação aguda compreende três componentes principais:

1) Vasodilatação, que são alterações no calibre vascular, que conduz a um aumento do fluxo sanguíneo;

2) Aumento da permeabilidade vascular, com conseqüente passagem de proteínas plasmáticas para o interstício, as quais não seriam filtradas em condições fisiológicas. O aumento da permeabilidade vascular somado ao aumento da pressão de filtração, por conseqüência da vasodilatação, leva à formação do edema inflamatório. Este fenômeno deve-se à ação de mediadores inflamatórios sobre as células endoteliais venulares, induzindo a contração das mesmas, o que permite a passagem de moléculas de alto peso molecular, tais como as proteínas plasmáticas, para o tecido inflamado (Majno, 1985).

3) Migração de leucócitos da microcirculação e seu acúmulo no foco da agressão (Williamns et al, 1985; Moncada et al, 1991). Os leucócitos ingerem os agentes agressores, destroem as bactérias e outros micróbios e degradam o tecido necrótico e os antígenos estranhos. Porém, os leucócitos podem prolongar a inflamação e induzir lesão tecidual mediante a liberação de enzimas, de mediadores químicos e de radicais livres do oxigênio (Dale e Foreman, 1989).

A mobilização adequada dos leucócitos, da microcirculação para o foco inflamatório (Tecido intersticial), é também uma etapa fundamental para a defesa do organismo e é denominada de extravasamento. Pode ser dividida nas seguintes etapas: (1) intraluminais: marginação, rolagem e adesão; (2) transmigração através do endotélio (também denominada de diapedese); e (3) migração nos tecidos intersticiais na direção do estímulo quimiotático (Rossi e Hallewell, 1994).

No sangue, que flui normalmente, os eritrócitos e os leucócitos ficam confinados a uma coluna axial e deixa em contato com o endotélio uma camada de plasma pobre em células. À medida que o fluxo torna-se lento no início da inflamação (como decorrência do aumento da permeabilidade vascular), os leucócitos saem da coluna central e assumem uma posição periférica, passando a margear a superfície endotelial. Este processo inicial, denominado marginação, é causado em grande parte por alterações nas condições hemodinâmicas geradas pela lenta circulação sanguínea (Carter e Robinson, 1998). Fileiras de leucócitos deslocam-se lentamente ao longo do endotélio e aderem transitoriamente (um processo denominado de rolagem), e finalmente, interrompem seu trajeto em algum ponto onde possam aderir firmemente nas paredes endoteliais (Kieda, 1998). Com o tempo, o endotélio passa a ser praticamente recoberto por leucócitos e adquire um aspecto “pavimentado”. Após a fase de adesão firme, o leucócito insere pseudópodes nas junções entre as células endoteliais, se espreme através das junções endoteliais e passa a se posicionar entre as células endoteliais e a membrana basal. Por fim, atravessa a membrana basal e escapa para o espaço extravascular para exercer seu papel (Bevilacqua et al., 1994). Tanto neutrófilos quanto monócitos, linfócitos e eosinófilos e basófilos empregam este trajeto (Butcher, 1991).

O recrutamento dos leucócitos circundantes para os tecidos é regulado em parte por múltiplas famílias de adesão (CAMs), que estão envolvidas na ligação de leucócitos com outros leucócitos, células endoteliais e ainda com componentes da matriz extravascular. As CAMs envolvidas nas interações adesivas entre as células no processo inflamatório foram classificadas em três famílias distintas: integrinas, superfamília das imunoglobulinas e as selectinas (Cronstein e Weissman, 1993). A família das selectinas consiste de três moléculas, denominadas *L-selectina* encontradas nos leucócitos e são responsáveis pelo endereçamento (homing) dos linfócitos para os linfonodos. *E-selectina* produzida pelo endotélio, sua síntese é induzida por IL-1, TNF α e LPS, e sua inibição é realizada por glicocorticóides, e *P-selectina*, constitutivamente sintetizadas por células endoteliais e plaquetas e ficam armazenadas nos grânulos de Weibel-Palade.

Devido ao fato de todos os membros da família das selectinas apresentarem um domínio lectínico N-terminal, estas são capazes de mediar a adesão entre as células, através do reconhecimento específico de um carboidrato na superfície celular da célula alvo. A regulação da expressão das moléculas de adesão e de sinalização pode modular o recrutamento e ativação dos leucócitos em tecidos inflamados (Chao et al., 1997).

Simultaneamente à expressão de selectinas, outras moléculas de adesão participam do processo de adesão dos neutrófilos às células endoteliais como: ICAM-1 e 2 (do inglês: intercellular adhesion molecule); VCAM-1 e 2 (do inglês: vascular cell adhesion molecule); α_2 -integrinas; α_4 -integrinas; além de vários componentes da matrix dos tecidos conjuntivos (fibronectina, vitronectina, laminina e colágeno) (Johnston e Kubes, 1999).

3.2 – Fisiologia das células envolvidas na inflamação

As células envolvidas na inflamação são: monócitos/macrófagos, mastócitos, neutrófilos, células endoteliais. Entretanto, como o objetivo deste estudo está focado nos tipos celulares macrófagos e neutrófilos, nos deteremos apenas nestes dois tipos celulares.

A) Monócitos/Macrófagos

A medula óssea produz células multipotentes mielóides que dão origem, na própria medula, aos granulócitos, eritrócitos, monócitos e plaquetas. Os monócitos fazem parte do sistema mononuclear fagocitário ou histiocitário, encontrando-se inicialmente no sangue, onde migram para os órgãos e tecidos conjuntivo, passando a serem chamados de macrófagos (Rang et al., 1996). Nos tecidos, os monócitos diferenciam-se e recebem diferentes denominações como: macrófagos pleurais e peritoneais (cavidades serosas), células de Kupffer (fígado), células microgliais (sistema nervoso central), macrófagos alveolares (pulmão), osteoblastos (osso).

Os macrófagos desempenham um papel fundamental na detecção e resposta às proteínas estranhas, células apoptóticas e células tumorais, devido a sua habilidade de fagocitar e destruir microorganismos, e pela capacidade de sinalizar outras células a participarem do processo (Klimp et al., 2002). Os macrófagos expressam em sua membrana vários receptores envolvidos nos processos de fagocitose contra microorganismos e células apoptóticas, onde podemos citar: CD48, receptor de manose (Peiser et al., 2002).

Após o contato com proteínas estranhas, os macrófagos passam a ser ativados produzindo e liberando vários mediadores inflamatórios como citocinas e prostanoídes (Oliani et al., 2001), além de óxido nítrico (NO) e radicais de oxigênio (Assureuy et al., 1994; Klimp et al., 2002). A ativação dos macrófagos dá-se via diferentes estágios, acompanhada por específica expressão de proteínas, a serem secretadas, além de proteínas de membrana, que podem produzir regulação sobre macrófagos em outro estado de ativação (Klimp et al., 2002) e sobre outras células como mastócitos, células endoteliais, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos.

Os principais mediadores celulares produzidos por macrófagos após sua ativação, mediando assim uma sinalização celular, são: prostaglandina E_2 (PGE_2); leucotrieno- B_4 (LTB_4); fator ativador de plaquetas (PAF); óxido nítrico (Coleman, 2001); e citocinas (Rang et al. 1996). As citocinas produzidas por macrófagos inter-relacionadas à inflamação são: interleucina 1 (IL-1); fator de necrose tumoral- α (TNF- α); interferon- γ (IFN- γ); interleucina 8 (IL-8) produzida por humanos, que é quimiotática para neutrófilos, interleucina 10 (IL-10); proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 e 2) (Duffy et al., 2000); fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) (Mitchell e Bucala, 2000); além das citocinas IL-15 e IL-18 que

estão envolvidas nos processos inflamatórios que ocorrem nas articulações, sendo detectadas nas mesmas concentrações de TNF- α (Liew e McInnes, 2001).

B) Neutrófilos

Dentre as células presentes no tecido inflamado, os neutrófilos são os primeiros que chegam ao foco inflamatório, porém, em condições normais estas células podem também migrar dos vasos aos tecidos (Wagner e Roth, 2000).

O processo pelo qual os neutrófilos migram ao foco inflamatório é conhecido como quimiotaxia, que não é uma função isolada e faz parte de uma complexa cadeia de eventos, sinalizadas por macrófagos, mastócitos e células endoteliais. Várias são as substâncias quimiotáticas capazes de induzir a quimiotaxia de neutrófilos. Dentre elas podemos citar: C5a (proteína derivada do sistema complemento); fMLP (do inglês: formyl methionyl leucyl phenylalanine, liberados de microorganismos); PAF (liberado de células endoteliais, plaquetas, macrófagos e de neutrófilos); as citocinas GM-CSF, TNF- α e as quimiocinas IL-8 (interleucina-8) em humanos, e CINC-1 (do inglês: cytokine-induced neutrophil chemottractant) em ratos e camundongos (Duffy et al., 2000).

O principal motivo pelos quais os neutrófilos são recrutados aos focos inflamatórios é fagocitar as bactérias, partículas, células mortas, pela liberação de fosfatase ácida e outras enzimas lisossomais, peroxidase (mieloperoxidase), proteínas básicas (catiônicas) ricas em argenina, e glicosaminoglicanas sulfatadas.

Para a digestão destas substâncias, os neutrófilos possuem diferentes tipos de grânulos citoplasmáticos, um conjunto de substâncias com atividades enzimáticas. Assim, nos grânulos azurófilos encontram-se, principalmente, lisoenzimas, mieloperoxidases, elastases, catepsinas, hidrolases ácidas entre outras. Os grânulos específicos contêm principalmente, lisoenzimas, colagenases e lactoferrina (Dale, 1984). Além da utilização do conteúdo destes grânulos, o processo de fagocitose ativa o metabolismo oxidativo celular, caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio e de produtos do seu metabolismo, os quais também possuem atividade microbicida (Doherty e Janusz, 1994). Embora as funções, tanto dos radicais livres como do

conteúdo destes grânulos citoplasmáticos, sejam a digestão e/ou morte do material fagocitado, observa-se, frequentemente, a destruição de partes do tecido inflamado em virtude a ação destas substâncias, as quais podem ser secretadas pelos leucócitos presentes no foco, ou então, serem liberadas após a morte dos mesmos (Doherty e Janusz, 1994).

3.3 – Mediadores Químicos dos processos inflamatórios

Os mediadores (**Tabela 3**) originam-se do plasma ou de células. Os mediadores oriundos de células normalmente estão sequestrados nos grânulos intracelulares, que precisam ser secretados (histamina nos grânulos de mastócitos) ou são sintetizados originalmente (Prostaglandinas, citocinas) em resposta a um estímulo (Contran et al., 2000). Substâncias endógenas e exógenas (fMLP, LPS, carragenina e zimozan) podem agir como agentes quimiotáticos.

Os mediadores endógenos são substâncias oriundas da ativação de células inflamatórias por uma reação imune ou por estimulação direta destas células por citocinas ou substâncias químicas. Muitos destes já foram identificados até o momento, podendo ser originados no plasma, sob a forma de precursores a serem ativados (proteínas do sistema complemento, das cininas e da coagulação) ou sintetizados e armazenados por células (serotonina, histamina, prostaglandinas, PAF, leucotrienos e citocinas). A maioria dos mediadores químicos desempenha sua atividade biológica através da ligação específica com receptores presentes em células, entretanto alguns podem atuar diretamente como enzimas (proteases lisossomais) ou mediando lesões oxidativas diretas como ocorre com os metabólitos do oxigênio (Robbins et al., 1994).

Um grande número de mediadores tem sido implicado no processo de migração dos leucócitos do sangue ao foco de inflamação. Acredita-se que na fase precoce do processo inflamatório induzido por diferentes estímulos, células residentes no tecido, como macrófagos, mastócitos e linfócitos, participam no controle da migração de neutrófilos. Este controle é mediado pela liberação destes fatores quimiotáticos.

Tabela 3: Mediadores da inflamação (Robbins et al., 1996)

<i>MEDIADOR</i>	<i>ORIGEM</i>	<i>AÇÕES</i>
<i>Histamina</i>	Mastócitos, Basófilos	Aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa, quimioquese
<i>Serotonina</i>	Plaquetas, Mastócitos (Roedores)	Aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa
<i>Fator ativador de plaquetas (PAF)</i>	Basófilos, Neutrófilos, Macrófagos	Liberação de mediadores das plaquetas; aumento da permeabilidade vascular; contração da musculatura lisa; ativação de neutrófilos
<i>Fator quimiotático para neutrófilos (FQN)</i>	Mastócitos, Basófilos	Quimiotaxia de neutrófilos
<i>IL-5</i>	Linfócitos	Localização dos monócitos
<i>C3a</i>	Complemento C3	Desgranulação de mastócitos; contração da musculatura lisa
<i>C5a</i>	Complemento C5	Desgranulação de mastócitos; quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos; ativação de neutrófilos; contração da musculatura lisa; aumento da permeabilidade capilar
<i>Bradicinina</i>	Sistema das Cininas (cininogênio)	Vasodilatação; contração da musculatura lisa; aumento da permeabilidade capilar; dor
<i>Fibrinopeptídeos e produtos da clivagem da fibronectina</i>	Sistema coagulação	Aumento da permeabilidade capilar; quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos
<i>Prostaglandina E2 (PGE₂)</i>	Via da ciclooxigenase	Vasodilatação; potencialização da permeabilidade vascular aumentada pela produção de histamina e bradicinina
<i>Leucotrieno 4 (LTB₄)</i>	Via da lipoxigenase	Quimiotaxia de neutrófilos, sinergia com PGE ₂ no aumento da permeabilidade vascular
<i>Leucotrieno D4</i>	Via da lipoxigenase	Contração da musculatura lisa; aumento da permeabilidade vascular

A) Aminas Vasoativas

As duas aminas, histamina e serotonina, são especialmente importantes porque estão disponíveis em reservas pré-formadas entre os primeiros mediadores a serem liberados durante a inflamação.

Histamina, a qual é formada pela descarboxilação do aminoácido histidina, é o maior componente dos grânulos de mastócitos, mas ainda encontrada nos basófilos e nas plaquetas. A histamina pré-formada está presente nos grânulos de mastócitos e é liberada por desgranulação dessas células em resposta a uma variedade de estímulos. A histamina exerce seus papéis através da interação com um dos três receptores distintos presentes nas células-alvo, conhecidos como H₁, H₂ e H₃. A maioria dos efeitos biológicos nas reações alérgicas é mediada pela ligação da histamina ao receptor H₁. Porém, para os mecanismos da inflamação, devemos ter uma especial atenção com o H₁, pois os endoteliócitos possuem esse receptor e, quando ele é estimulado pela ação da histamina, a célula se contrai resultando em um aumento da permeabilidade vascular das vênulas pós-capilares.

Serotonina (5-hidroxitriptamina) é um segundo mediador vasoativo pré-formado com ações semelhantes às da histamina. Está presente nas plaquetas e células enterocromafins, e nos mastócitos em roedores, mas não no ser humano. A liberação de serotonina (e histamina) das plaquetas é estimulada quando as plaquetas se agregam após contato com o colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP) e complexos antígeno-anticorpo (Contran et al.,2000).

B) Metabólitos do Ácido Araquidônico (AA)

As células são ativadas por diferentes estímulos. Os lipídeos das membranas celulares são rapidamente remodelados para gerar mediadores lipídicos biologicamente ativos que servem como sinais intracelulares ou extracelulares. Os produtos derivados do metabolismo do AA influenciam uma variedade de processos biológicos, incluindo a inflamação e hemostasia.

O AA é um ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos que é derivado diretamente de fontes alimentares ou por conversão do ácido graxo essencial, o ácido linoléico. Não ocorre livremente nas células, mas normalmente é esterificado em fosfolipídeos da membrana. É

liberado de fosfolípidos da membrana através da ativação de fosfolipases celulares (fosfolipase A2) por estímulos mecânicos, químicos e físicos ou por outros mediadores (C5a). Os metabólitos do AA, também chamados eicosanóides, são sintetizados por duas classes principais de enzimas: ciclooxigenase (prostaglandinas e tromboxanos) e lipooxigenases (leucotrienos e lipoxinas).

1) Via da ciclooxigenase: mediada por duas enzimas diferentes (COX-1 e COX-2), leva à geração de prostaglandinas. As prostaglandinas dividem-se em séries baseadas nas características estruturais codificadas por uma letra (PGD, PGE, PGF, PGG e PGH) e um numeral subscrito (1,2), que indica o número de ligações duplas no composto. As mais importantes na inflamação são as prostaglandinas (PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂) e o tromboxano A₂, que é um importante agregador plaquetário e vasoconstritor. As prostaglandinas, principalmente a PGE₂ e a prostaciclina, são mediadores importantes da vasodilatação inflamatória e potenciam, de modo acentuado, os efeitos quimiotáticos e de aumento da permeabilidade de outros mediadores (Rang et al., 1996).

2) Via da lipoxigenase: os produtos iniciais são gerados por três lipoxigenases (LO) diferentes, que estão presentes em apenas alguns tipos de células. A 5-lipoxigenase (5-LO) é a enzima predominante nos neutrófilos. A ativação celular, a 5-LO transfere-se para a membrana nuclear e interage com uma proteína reguladora associada à membrana, denominada proteína ativadora de 5-LO (FLAP), para formar o complexo enzimático ativo. O principal produto, 5-HETE, que é quimiotático para neutrófilos, é convertido em uma família de compostos coletivamente conhecidos como leucotrienos. O LTB₄ é um agente quimiotático potente e ativador das respostas funcionais de neutrófilos, como agregação e aderência de leucócitos ao endotélio venular, geração de radicais livres de oxigênio e liberação de enzimas lisossômicas. Os leucotrienos que contêm cisteinil C₄, D₄ e E₄ (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) causam vasocronstrição intensa, aumento da permeabilidade vascular (Contran et al., 2000; Spriger, 1994).

C) Fator Ativador Plaquetário

O ativador de plaqueta (PAF) é gerado a partir de um fosfolípido de membrana por ativação de fosfolipases. Tem a capacidade de ativar uma variedade de células, incluindo plaquetas. Este fator pode atuar na degranulação de neutrófilos e eosinófilos, sendo o mais potente quimiotático para eosinófilos já descrito. O PAF gera também um aumento da adesão leucocitária ao endotélio (por estímulo à ligação da integrina aos leucócitos) e da quimiotaxia. Este mediador atua diretamente nas células-alvo de receptores específicos, mas potencializam também a síntese de outros mediadores, principalmente os metabólitos do AA (Wasserman, 1988).

D) Citocinas

As citocinas constituem um grupo heterogêneo de glicoproteínas, sintetizadas e secretadas de modo típico por diversas células, principalmente macrófagos e linfócitos, em resposta à ativação ou lesão. Estas proteínas atuam como sinais modulando as respostas imunes e inflamatórias locais ou sistêmicas. Geralmente, células normais precisam ser estimuladas para produzirem citocinas. As citocinas, em geral, são peptídeos ou glicoproteínas com pesos moleculares variando de 6 a 60 kDa. São extremamente potentes, atuam em concentrações milimolares na estimulação de células, após interação específica entre ligante e receptor.

Além de serem produzidas por diferentes tipos de células, as citocinas podem exercer seus efeitos em várias células, e, devido a essa ação pleiotrópica, desencadeiam diferentes atividades, podendo ser sinérgicas ou antagônicas, ou, ainda, induzir ou inibir a produção de outras citocinas bem como modular a expressão de seus receptores.

1) Citocinas pró-inflamatórias:

Tem sido demonstrado que várias citocinas induzem a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, tanto *in vivo* como *in vitro*, e estão envolvidas em vários eventos da resposta inflamatória. As principais citocinas mediadoras de inflamação são a IL-1, TNF- α , IL-2, IL-12, IL-6, e as quimiocinas, entre as quais estão a IL-8, MIP, MCP-1 e a ENA-78.

As principais citocinas que medeiam a inflamação compartilham muitas propriedades biológicas. A IL-1 e o TNF- α são produzidos por macrófagos ativados, TNF- β (previamente conhecido como linfotóxina) por células T ativadas e a IL-1 por muito outros tipos celulares. Sua secreção pode ser estimulada por endotoxina, imunocomplexos, toxinas, lesão física e uma variedade de processos inflamatórios. Suas ações mais importantes na inflamação são seus efeitos sobre o endotélio, leucócitos e fibroblastos e indução das reações da fase aguda sistêmica. Em particular, induzem a síntese de moléculas de aderência endotelial e mediadores químicos – incluindo outras citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, eicosanóides e óxido nítrico (NO) (Rang et al., 1996).

E) Quimiocinas

São uma superfamília de proteínas pequenas (8 a 10 kDa) que atuam primariamente como ativadores e quimiotratores para tipos específicos de leucócitos, possuindo semelhanças em suas sequências de aminoácidos. Duas destas famílias têm sido extensivamente estudadas, as α e β -quimiocinas (Contran et al., 2000).

Entre os papéis biológicos definidos para as quimiocinas estão: 1) efeito quimiotático direto e indireto; 2) promovem a diferenciação e crescimento celular; 3) regulação da hematopoiese e angiogênese; 4) aumentam a adesão e capacidade de ligação dos leucócitos; 5) possível papel no crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases; 6) atividade anti-tumoral (Bem-Baruch et al., 1995).

O aumento na secreção de quimiocinas durante a inflamação resulta no recrutamento seletivo de leucócitos para o tecido inflamado. A ativação pelas quimiocinas leva a uma interação de alta afinidade na superfície dos leucócitos e seus ligantes endoteliais. Esta interação, por sua vez, facilita a adesividade do leucócito e seu posterior extravasamento (Bishoff et al, 1990).

F) Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel, sintetizado a partir da L-arginina, do oxigênio molecular e do NADPH por ação da óxido nítrico sintase (NOS), nas células endoteliais e

neurônios, onde está presente constitutivamente e pode ser ativado pelo cálcio e calmodulina, ou nos macrófagos, onde sua síntese é induzida por citocinas ou por outros agentes. Muitos estudos têm proposto ao NO um papel regulador no recrutamento de leucócitos (Kubes et al., 1991). Há três tipos diferentes de NOS – endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível por citocinas (iNOS), que exibem dois padrões de expressão (Hobbs et al., 1999; Thomazzi et al., 2004).

O NO desempenha um papel importante na função vascular durante as respostas inflamatórias. Ele reduz a agregação e aderência plaquetária, inibe várias características da inflamação induzida por mastócitos e serve como regulador do recrutamento de leucócitos. O bloqueio da produção de NO sob condições normais promove rolagem e aderência de leucócitos nas vênulas pós-capilares, e a administração de NO exógeno reduz o recrutamento. Assim a hiperprodução de NO por iNOS é um mecanismo compensatório endógeno que reduz o recrutamento de leucócitos nas respostas inflamatórias (Rang et al., 1996).

G) Radicais livres derivados de oxigênio

Estes radicais podem ser liberados no meio extracelular por leucócitos após exposição a agentes quimiotáticos, imunocomplexos, ou uma provocação fagocítica. Sua produção depende da ativação do sistema oxidativo do NADPH. O ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH) são as principais espécies produzidas dentro da célula, e esses metabólitos podem se combinar com NO para formar outros intermediários reativos de nitrogênio. A liberação extracelular de baixos níveis desses mediadores potentes pode aumentar a expressão de quimiocinas, citocinas e moléculas de aderência endotelial de leucócitos, amplificando a cascata que suscita a resposta inflamatória. Em níveis mais altos, a liberação desses mediadores potentes pode ser lesiva para o hospedeiro (Contran et al., 2000).

H) Neuropeptídeos

Semelhantes às aminas vasoativas e aos eicosanóides, previamente discutidos, participam do desencadeamento de uma resposta inflamatória. Os peptídeos pequenos, como a substância

P e neurocinina A, pertencem a uma família de taquicininas neuropeptídicas nos sistemas nervoso central e periférico. As fibras nervosas que contêm substância P são proeminentes no pulmão e trato gastrointestinal. A substância P possui muitas funções biológicas, incluindo a transmissão de sinais dolorosos, regulação da pressão arterial e estimulação da secreção por células imunes e endócrinas, mas é notável como um mediador potente do aumento da permeabilidade vascular. Atua por ligação a um receptor acoplado à proteína G que ostenta sete domínios transmembrana (NK-1R) (Coltran et al, 2000).

3.4 – Lectinas vegetais e eventos imunológicos

3.4.1 – A migração de leucócitos e as lectinas vegetais

Algumas lectinas de plantas podem mimetizar as lectinas endógenas de mamíferos e induzir a migração de neutrófilos e células mononucleares *in vivo* e *in vitro* (Bento et al., 1993; Santos de Oliveira et al., 1994). Mais recentemente, foi demonstrado que a lectina de soja também pode induzir a migração de neutrófilos e de linfócitos *in vivo* e ativar as células mononucleares (Benjamim et al., 1997). Outros exemplos de indução foram demonstrados com lectinas isoladas de *Canavalia brasiliensis* (Moreira e Cavada, 1984), *Dioclea grandiflora* (Moreira et al., 1983), onde foi observada a exsudação de proteína além da migração de neutrófilos em ratos, de modo dose-dependente (Bento et al, 1993).

Estudos realizados por Santos de Oliveira et al. (1994), mostram que a lectina ligante de manose, extraída de *Artocarpus integrifolia* (KM+), estimulou a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos de modo dose-dependente. Essa atividade foi inibida com a utilização de 0,1 M de manose tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Estes resultados sugerem que através de sítios ligantes de carboidratos, KM+ possa interagir com um açúcar presente na superfície de neutrófilos e com outro, ligar-se a glicoconjugados na matriz extracelular. Esta interação pode gerar um gradiente de substrato necessário ao direcionamento de neutrófilos para sítio de inflamação.

A lectina de sementes de *Erythrina velutina* (EVFA) também promove a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos. Concomitantemente, foi realizado um estudo da atividade pró-inflamatória dessa lectina em bolsa de ar dorsal. Esta cavidade, caracterizada pela escassez de células residentes, permitiu observar que EVFA também é capaz de induzir a migração de neutrófilos independente da presença de outras células residentes (Moraes et al., 1996). Com esses resultados propõe-se que essa lectina, com especificidade a galactose, possua um mecanismo de indução de migração baseado no reconhecimento direto de glicoproteínas da superfície de neutrófilos, assim como foi observado e proposto por Dias-Baruffi et al., (1995a, 1995b), que afirmaram que o reconhecimento desses carboidratos também pode desempenhar um papel na atração dos neutrófilos.

Outro exemplo é de uma nova lectina isolada de sementes de *Talisia esculenta* (TEL), que pertence à família Sapindaceae (Freire et al., 2001, 2002) e possui especificidade para glicose/manose. Neste trabalho ficou comprovado que TEL é capaz de induzir a migração de neutrófilos e de células mononucleares de modo dose-dependente, tanto no modelo de cavidade peritoneal quanto em bolsa de ar em camundongo.

Alencar et al. (2003) investigou uma lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML) na migração de leucócitos, assim como o papel de macrófagos residentes. Foi observado que a injeção intraperitoneal de VML induz a migração celular de neutrófilos e de células mononucleares na cavidade peritoneal de ratos. Foi também demonstrado que VML exibe uma atividade pró-inflamatória em outros dois modelos de inflamação como edema de pata e bolsa de ar. Os resultados sugerem que VML induz a migração por uma via indireta e que pode ser mediada por macrófagos residente. Esta evidência é suportada pelas seguintes observações: a) lavagem da cavidade peritoneal, a qual reduz as células residentes, diminui a migração induzida por VML, mas não modifica a resposta ao controle (fMLP); b) o aumento da população de macrófagos pelo tratamento com tioglicolato e o aumento do recrutamento de neutrófilos por VML e c) indução de migração de neutrófilos por VML no modelo de bolsa de ar, onde a população celular é essencialmente de macrófagos (Ribeiro et al., 1991). Na luz dessas observações, sugere-se que VML pode causar a migração de neutrófilos provavelmente através do aumento de fatores quimiotáticos para neutrófilos, secretados pelos macrófagos residentes (Alencar et al., 2003).

Pelo fato de que as selectinas apresentam um domínio lectínico, sugere-se que a resposta inflamatória possa ser controlada pela competição entre as lectinas vegetais e as selectinas, por glicoconjugados, inibindo ou controlando a migração de leucócitos para o local da inflamação. Estas abordagens levaram a investigação do possível efeito pró-inflamatório da lectina manose/glicose-ligante extraída de sementes de *Annona coriacea*.

II - OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade biológica da lectina de sementes de *Annona coriacea* (ACLEC), em relação a:

- Estudo da atividade inseticida da lectina sobre dois lepidópteros através de ensaios *in vitro* e *in vivo*;
- Estudo da ação farmacológica, utilizando como modelo biológico, a indução de migração de neutrófilo na cavidade peritoneal de camundongos.

III – MATERIAIS

1. Material Biológico

1.1 – A planta

Annona coriacea, conhecida também pelos nomes Marolo ou Araticum-do-campo é uma espécie pertencente à família Annonaceae (Figura 6). É uma planta decídua, heliófita, seletiva xerófita, floresce durante os meses de novembro a janeiro e amadurece no período de novembro-dezembro. Estão amplamente distribuídos pelos cerrados dos estados da Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Lorenzi, 1992).

Árvore de tamanho variável podendo atingir até 7 m de altura de acordo com a espécie. Folhas rígidas, dispostas caracteristicamente intercaladas na posição horizontal ao longo dos ramos. Flores freqüentemente carnosas, de coloração esverdeada ou branco-amarelada.

O fruto é globoso ou alongado que contém numerosas sementes presas a uma polpa branca, aquosa, mole, envolvida por uma casca de coloração amarelo-esverdeada, lisa ou recoberta por escamas carnosos. Frutificam durante quase todo o ano. Propaga-se por sementes ou por garfagem. Prefere clima quente, porém com pouca chuva e estação seca bem definida. Começa a produzir 3 anos após o plantio (Lorenzi, 1992).

A família das Annonaceae engloba uma grande variedade de frutos e de maneira geral, as plantas dessa família caracterizam-se por apresentarem folhas simples. Dispostas alternadamente em um mesmo plano, ao longo dos ramos e pela semelhança entre seus frutos.

Neste trabalho foram utilizadas sementes de Marolo, coletadas no cerrado da região de Três Lagoas – Mato Grosso do Sul.

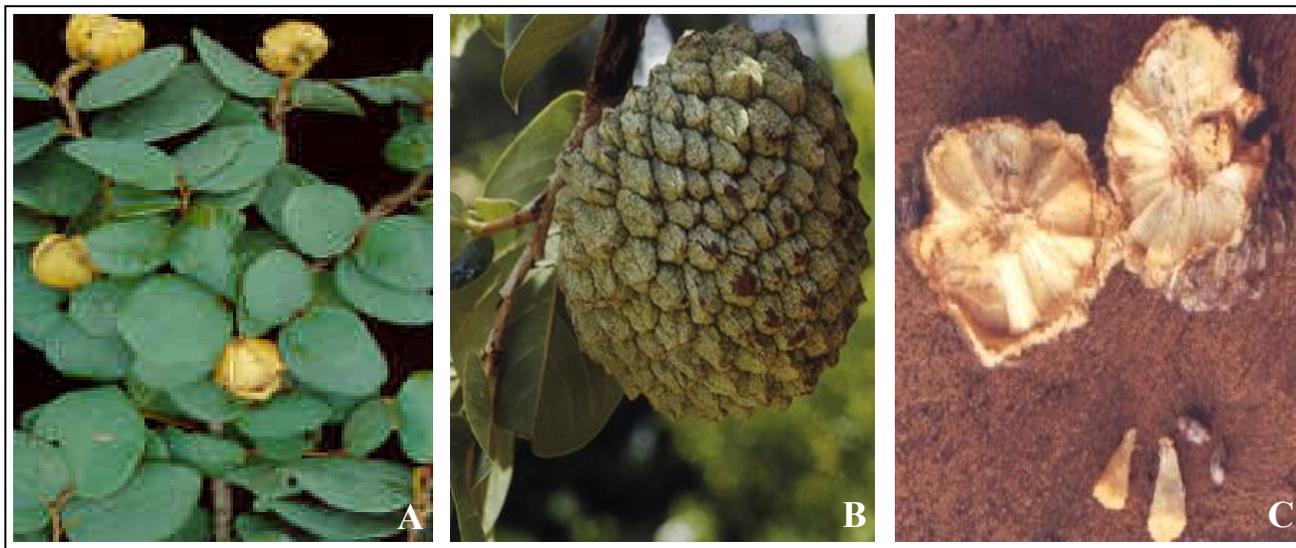


Figura 6: *Annona coriacea* (Marolo): (A) flor e folhas, (B) frutos (Fotos www.bibvirt.futura.usp.br), (C) sementes (Fotos de www.arvores.brasil.nom.br)

1.2 – Insetos

Os insetos da ordem Lepidóptera, família Pyralidae, utilizados no estudo do papel inseticida da lectina de *Annona coriacea* foram às espécies *Anagasta kuehniella* Zeller (Figura 7) e *Corcyra cephalonica* Stainton (Figura 8). As colônias de ambas as espécies formam fornecidas pelo Dr. J. R. P. Parra (laboratório de Biologia dos Insetos da Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, SP) e são mantidas em condições ideais e rigorosamente controladas no Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB) no Centro Universitário de Três Lagoas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Essas duas colônias forma mantidas na temperatura de 28 ± 1 °C e uma umidade relativa de 65 – 75% e em período diários de iluminação de 16 horas, com dieta padrão de gérmen de trigo.

Os adultos da espécie *Anagasta kuehniella* possuem cabeça pequena e globosa. Medem cerca de 2 cm de envergadura. As asas anteriores são de cor cinza com faixas onduladas negras. As asas posteriores são claras, quase brancas com faixas de pêlos curtos. A fêmea deposita aproximadamente 300 ovos em meio às impurezas dos grãos. A larva é de cor branca ligeiramente rosada com pequenos pontos negros pelo corpo. Mede mais ou menos 12 mm

quando totalmente desenvolvida. Seu casulo é de cor café e seu ciclo biológico é de aproximadamente 8-9 semanas, se as condições de temperatura e umidade relativa forem apropriadas. A temperatura favorável é de 26 °C e a umidade relativa ideal são de 70%. O ciclo de vida total dura em trono de 3 a 4 meses e, sob condições adequadas de temperatura e umidade, tem aproximadamente quatro gerações por ano. O adulto vive em trono de 14 dias e se alimenta de produtos armazenados. É uma praga secundária de grãos e cereais saudáveis e inteiros. Praga primária de farinha e outros produtos moídos de cereais e oleaginosas. Provocam prejuízos em maquinarias de moinhos. Estão distribuídas em todo o mundo.



Figura 7: (A) inseto adulto, (B) larva e (C) pupa de *Anagasta kuehniella* (foto retirada da página www.biotech.at/Schaedling.htm).

Os adultos da espécie *Corcyra cephalonica* medem de 7 a 13 mm de envergadura, isto é, com as asas estendidas. As asas anteriores são de cor canela-clara, sem manchas visíveis, e as nervuras são ligeiramente mais escuras. A 18 °C o seu desenvolvimento não é completado. A fêmea coloca entre 100 e 200 ovos de forma indiscriminada, sobre superfícies rugosas dos grãos ou produtos armazenados, muros e pisos. O acasalamento é logo após a emergência durante o período de 1 a 2 dias, e a ovoposição é predominantemente à noite. Os ovos são pegajosos e de coloração branco-pérola, são colocados em maior número no 2º e 3º dias após a emergência. A larva é brnaca, listras azuladas e verdes. A larva passa por seis instares, chegando a atingir 15 mm quando está completamente desenvolvida. Sua presença é detectada por grumos formados por uma teia que adere os grãos; é nesta teia que ela faz seu casulo para a empulpação. A pupa mede cerca de 8 mm. Seu ciclo biológico dura aproximadamente seis

semanas em condições apropriadas. O adulto tem vida curta, 6 a 22 dias, sendo o macho de vida mais longa. É uma praga primária para o arroz polida e secundária para outros produtos. Também se alimentam de grãos e farinhas de cereais, cacau, chocolate, frutas secas, tortas e farinhas de oleaginosas, entre outros produtos. Está amplamente distribuída, mas é comumente encontrada em regiões tropicais.



Figura 8: (A) inseto adulto (foto retirada da página www.nfri.affr.go.ip/research/seika/seikah9/nfri97031.htm) e (B) larva de *Corcyra cephalonica* (foto retirada da página <http://lamar.colostate.edu>).

1.3 – Camundongos

Foram usados camundongos Swiss machos, pesando 25 a 30 g, provenientes do Centro Multi-Disciplinas para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp. Esses animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia, pelo menos 24h antes dos experimentos, onde foram mantidos a 24 °C, com iluminação diária de 12h e com água e alimentação *ad libitum* (“*a vontade*”). Todos os experimentos com animais foram realizados conforme as diretrizes do cuidado animal da Universidade de Campinas.

2 – Reagentes

Todos os reagentes utilizados na realização deste trabalho foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

2.1 – Carboidratos e Drogas utilizadas

Os açúcares D.glucose, D-manose e sacarose foram obtidos da Sigma Chem, Co. (St. Louis, MO, USA).

No estudo da ação farmacológica da lectina de *Annona coriacea*, foram utilizadas as seguintes drogas: AA-861, aminoguanidina, dexametasona, L-NAME (N^ω-nitro-L-arginina metil ester) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). PCA 4248 ((2-feniltio)etil-5-metoxicarbonil-2,4,5,-trimetil-1,4-diidropiridina-3-carboxilata) e celecoxibe foram obtidos da Alexis (Nottingham, UK) e Laboratórios Pfizer Ltd (São Paulo, Brazil), respectivamente. SR140333 ((S)1-{2-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(3-isopropoxifenilacetil) piperidim-3-yl]etil}-4-fenil-1-azoniabicyclo[2.2.2.]octane cloreto) e SR48968 ((S)-N-methyl-N[4-(4-acetilamino-4-fenilpiperidino)-2-(3,4,-diclorofenil)butil]benzamida) foram obtidos da Sanofi Recherche (Montpellier, France).

A heparina foi obtida do Laboratório Roche (Rio de Janeiro, BR). O halotano é proveniente de Cristália Pro. Quim. Farm. LTDA (Itapira, BR).

IV – MÉTODOS

1 – Caracterização físico-química da lectina isolada de sementes de *Annona coriacea* (ACLEC)

ACLEC foi obtida pela trituração das sementes em moinho de grande porte e um moinho analítico para a obtenção de uma farinha fina. Esta foi submetida a uma delipidação com hexano devido à presença de lipídeos nas sementes. A farinha delipidada foi submetida a uma extração com tampão fosfato de potássio monobásico 0,1 M, pH 7,6, na proporção de 1:6 (p/v), sob agitação constante durante 12 horas à 4 °C. Após a homogeneização manual, o material foi centrifugado a 5,000 x g durante 30 minutos, obtendo-se assim um precipitado que foi descartado, e um sobrenadante denominado de extrato bruto (EB), que foi dialisado, liofilizado (Coelho et al., 2003).

O EB (extrato bruto) liofilizado foi diluído em tampão fosfato de potássio monobásico 0,1 M, pH 7,6, contendo NaCl 0,1 M e a solução aplicada numa coluna de cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75 equilibrada com o mesmo tampão. Nesta etapa, foram obtidos três picos protéicos, mas apenas uma fração (ACLE-2) apresentou atividade hemaglutinante, e sendo então dialisada e liofilizada. Em seguida, ACLE-2 foi submetida a uma cromatografia de fase reversa (HPLC) em coluna C18 μ -Bondapack equilibrada previamente com TFA 0,1%. A eluição da lectina absorvida foi realizada com um gradiente linear de TFA em ACN (66%). A fração com atividade hemaglutinante obtida neste passo cromatográfico foi denominada ACL/HPLC. Depois de liofilizado, o pico ACL/HPLC foi submetido a recromatografia em coluna C18 μ -Bondapack em sistema HPLC com um gradiente de TFA (0,1%) contendo ACN (40-70%), foram obtidos dois picos protéicos, dos quais apenas o segundo apresentou atividade hemaglutinante e foi denominado de ACLEC.

Após os passos de purificação, a lectina purificada foi submetida a análise de sua pureza através de SDS-PAGE (12,5%) onde se pode observar que ACLEC é uma glicoproteína que possui peso molecular de 14 kDa reduzido ou não com β -mercaptoetanol, indicando que suas subunidades não estão interligadas por pontes dissulfeto. A M_r da lectina intacta estimou ser de 40 kDa em Superdex G-75, indicando que ACLEC é composta por três

subunidades idênticas que estão associadas por interações hidrofóbicas e/ou pontes de hidrogênio.

ACLEC possui especificidade para todos os eritrócitos humanos e através de ensaios de inibição por carboidratos observou-se que ACLEC possui especificidade apenas para D-manose e D-glucose.

1.1 – Cromatografia de afinidade

O método utilizado na preparação de quitina foi descrito por Hackman & Goldberg (1964). Carapaças de lagosta foram finamente moídas e cerca de 50 g desta farinha foram suspensas em 1000 ml de HCl 0,1 N. A mistura foi incubada por 24 h e, a seguir, centrifugada à 7500 x g por 20 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 500 ml de NaOH 0,1 N. Esta mistura foi aquecida à 100 °C por 16 horas, esfriada e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido mais duas vezes e, ao término, realizou-se uma centrifugação à 7500 x g por 20 minutos à 4 °C. O precipitado foi seco e guardado para utilização posterior.

Uma coluna de quitina (2 cm x 6 cm; 20 ml de leito) foi equilibrada com tampão fosfato 0,05 M, pH 7,6 e utilizada numa cromatografia de afinidade. Após a adsorção das proteínas (10 mg de proteínas em 1 ml de tampão fosfato), a coluna foi inicialmente eluída com o mesmo tampão até que a leitura da absorbância em 280 nm, retornasse a zero. A lectina adsorvida foi eluída com HCl 0,1 M. Frações de 2 ml foram coletadas e a concentração de proteína foi estimada pela leitura da absorbância em 280 nm. A atividade hemaglutinante das frações foi determinada após o ajuste de pH para 7,0, quando necessário.

2 – Estudos da atividade inseticida da lectina isolada de sementes de *A. coriacea*

2.1 – Ensaios *in vitro*

2.1.1 – Preparação do homogenato de intestinos médios de larvas de *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*

As larvas dos lepidópteros (4º instar de desenvolvimento) foram imobilizadas por ação de baixa temperatura por alguns minutos para facilitar a dissecação do seu intestino (IM) (Macedo et al., 1995). Em seguida, os intestinos médios foram cuidadosamente retirados com o auxílio de pinças e sob lupa estereoscópica numa solução de NaCl 150 mM e guardados numa temperatura de -20 °C. Os intestinos médios (IM) de *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica* foram homogeneizados em Potter numa solução de NaCl 150 mM, em banho de gelo, durante 10 minutos, obtendo-se um extrato (10 IM/ml). O extrato foi centrifugado a 6,000 x g durante 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi imediatamente utilizado nos ensaios enzimáticos.

2.1.3 – Ação da lectina na atividade enzimática do inseto

A atividade triptica dos extratos intestinais e das amostras fecais de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* alimentadas com dietas contendo 2% de ACLEC e alimentadas com dieta controle foram avaliadas utilizando o substrato sintético N α -benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPNA) (Erlanger, 1961). Para os ensaios rotineiros, BAPNA foi utilizado em uma concentração final de 1 mM em 1% (v/v) DMSO em um volume final de 1,5 ml e pH 8. O tampão e a enzima foram pré-incubados a 37 °C por 10 min antes de adicionar o substrato para iniciar a reação, a qual foi acrescentada para continuar por 20 min e então parada com 200 μ l de ácido acético 30% (v/v). A hidrólise é acompanhada fotometricamente a 410 nm. A atividade enzimática é determinada pela quantidade em nmol de BAPNA hidrolisado. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

2.1.3 – Atividade proteinase dos intestinos médios e extratos fecais em gel de poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina

As proteínas extraídas dos intestinos médios e dos extratos fecais das larvas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* alimentadas com dietas com ou sem 2% de ACLEC, sem prévio aquecimento ou redução, foram corridas em SDS-PAGE (em gel de 10%). As proteínas dos intestinos médios e dos extratos fecais das larvas liamentadas em dieta artificial e alimentadas com ACLEC foram incubadas com TLCK (N-p-tosil-lisina clorocetona, 1 mM) por 10 min a 30 °C. Estas misturas foram então corridas em SDS-PAGE em géis contendo 0,1% de gelatina. Após a eletroforese a 5°C, os géis foram lavado com uma solução de Triton X-100 2,5% por 2 h sob agitação contínua para remover o SDS, após esse procedimento, os géis foram encubados com Tris-HCl 0,1 M, pH 8 por 2-3 h. Os géis foram subsequentemente corados com Coomassie brilliant blue R-250 (Michaud et al., 1993).

2.2 – Ensaios *in vivo*

2.2.1 – Efeito da lectina sobre o desenvolvimento larval dos lepidópteros

A) Sobrevivência e Peso médio larval

Para examinar os efeitos de ACLEC sobre o desenvolvimento dos insetos, dietas artificiais contendo a lectina nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0% (w/w) foram fornecidas ao inseto *Anagasta kuehniella* e dietas artificiais contendo a lectina nas concentrações 1,0% e 2,0% foram oferecidas ao inseto *Corcyra cephalonica*. Para cada dieta de cada espécie de inseto, 5 ovos foram colocados em potes plásticos claros contendo 200 mg de dieta artificial, e fechado hermeticamente. Cada tratamento foi repetido 10 vezes (n= 5x10). Após 22 dias de incubação a 28 °C e umidade relativa de 65-70%, as larvas sobreviventes foram contadas e o peso individual foi determinado. Dietas sem a adição de ACLEC foram preparadas e fornecidas às larvas, constituindo assim o grupo controle de cada tratamento.

B) Consumo e utilização do alimento

Para a realização dos estudos de consumo e utilização do alimento, ao fim do período de alimentação necessário para as larvas atingirem o 4^o instar, a dieta restante foi retirada do pote plástico e pesada, assim como as fezes depositadas pelas larvas. Para a determinação dos índices nutricionais a metodologia de Scriber & Slansky Jr (1981) foi adotada. Para o cálculo desses índices, foram utilizados os seguintes parâmetros: (T): duração do período de alimentação em dias; (Ar): peso do alimento fornecido ao inseto; (F): peso das fezes produzidas; (B): ganho de peso pelo inseto; (C): peso médio das larvas; (I): peso do alimento ingerido; (I – F): alimento assimilado e (M): alimento metabolizado [M + (I – F) – B]. Os parâmetros Ar, F, B, C, I e (I – F) só foram considerados durante o período de alimentação (T).

Com base nestes parâmetros, foram determinados os índices de consumo e utilização para cada tratamento, através das seguintes fórmulas:

- *Digestibilidade aparente (%)*: **AD = [(I – F) / I] x 100**

- *Eficiência de conversão do alimento ingerido (%)*: **ECI = [(B / I)] x 100**

- *Eficiência de conversão do alimento digerido (%)*: **ECD = [{B/ (I – F)}] x 100**

- *Custo metabólico (%)*: **CM = 100 – ECD**

2.3 – Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média dos valores \pm S.E.M. para n experimentos. A avaliação estatística foi combinada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. Um valor de *P* menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3 – Estudo da atividade pró-inflamatória da lectina de *A. coriacea*

3.1 – Efeito da injeção intraperitoneal da lectina de *A. coriacea* em induzir migração de neutrófilos e células mononucleares para a cavidade peritoneal de camundongos

A migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos, foi avaliada de acordo com a técnica descrita por Souza et al. (1988). Para isto, os animais foram divididos em grupos (n=5), sendo que o grupo controle recebeu uma injeção intraperitoneal (i.p.) de 0,1 ml de veículo (PBS) e os grupos tratados receberam 0,1 ml de ACLEC (3-100 µg/cavidade). A migração de neutrófilos foi avaliada 4, 8, 16, 24, 48, 72 e 96 h após a injeção da lectina. Para isto, os animais foram sacrificados, sendo a cavidade peritoneal lavada em seguida com 5 ml de PBS contendo heparina (5 UI/ml). Após leve massagem, retirou-se o maior volume possível do lavado.

A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se 20 µl do lavado, diluídos em 400 µl de solução de Turk. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada após a confecção de lâminas, sendo que para isto 100 µl do lavado foram centrifugados em citocentrífuga. As lâminas foram coradas a seguir, com corante May-Grünwalds e a leitura feita em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (objetiva de imersão em óleo). Em cada lâmina foram contadas as células, diferenciando neutrófilos e células mononucleares. O número de cada tipo foi calculado a partir da porcentagem encontrada, em relação ao número total de células.

3.2 – Efeito de açúcares sobre a migração de neutrófilos em camundongos, induzido pela lectina de *A. coriacea*

ACLEC foi administrada pelas vias intraperitoneais (i.p.) isoladamente ou em associação com 0,1 M de açúcares específicos (D-glicose ou D-manose) e não específico (sacarose). A lectina foi incubada com os diversos açúcares por 12 horas, a 37 °C e logo depois injetada nos

animais. Os animais tratados com os carboidratos apenas foram utilizados como controles. A migração foi avaliada 16 horas após os tratamentos.

3.3 – Efeito de moduladores farmacológicos na migração de neutrófilos induzida pela lectina de *A. coriacea*

ACLEC (30 µg) foi injetada nos animais tratados com PBS e nos animais previamente tratados com:

(1) dexametasona (0,5 mg/kg) é um glicocorticóide que inibe a liberação de mediadores quimiotático dos neutrófilos e/ou expressão de certas enzimas inflamatórias, foi administrada s.c. 1h antes da injeção de ACLEC (Cunha e Ferreira, 1989);

(2) Celecoxibe (3mg/kg), inibidor seletivo da ciclooxigenase-2 foi administrado s.c. 1h antes da administração de ACLEC (Filiatre et al., 2001);

(3) AA-861 (02 mg/kg), inibidor da lipoxigenase foi administrado i.v. 15 min antes da administração de ACLEC (Filiatre et al., 2001);

(4) PCA 4248 (5 mg/kg), antagonista do receptor do fator de ativação plaquetária (PAF), foi administrado i.v. 1 h antes a injeção de ACLEC (Filiatre et al., 2001);

(5) SR140333 (100 µg/kg), antagonista da Taquicinina NK₁, foi administrado i.v imediatamente antes a injeção intraperitoneal de ACLEC (Costa et al., 2001);

(6) SR48968 (1 mg/kg), antagonista de Taquicinina NK₂, foi administrado imediatamente antes da administração de ACLEC (Inoue et al., 1997);

(7) L-NAME (20 mg/kg), inibidor da síntese de NO, foi administrado i.v. imediatamente antes da injeção de ACLEC (Franco-Penteado, et al., 2001);

(8) Aminoguanidina (75 mg/kg), inibidor seletivo de iNOS foi administrada i.v. imediatamente antes da administração de ACLEC (Franco-Penteado et al., 2001).

A migração dos neutrófilos foi avaliada 16 h após a administração de ACLEC.

3.4 – Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média dos valores \pm S.E.M. para n experimentos. A avaliação estatística foi combinada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações. Um valor de P menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

V – RESULTADOS

1 - Estudo da atividade inseticida da lectina isolada de sementes de *Annona coriacea*

1.1 - Efeito de ACLEC sobre o desenvolvimento larval de *Corcyra cephalonica*

A) Sobrevivência e peso médio das larvas de *C. cephalonica*

O efeito de ACLEC sobre o lepidóptero *C. cephalonica* foi avaliado através da determinação do número de indivíduos e o peso médio das larvas de 4º instar em dietas artificiais contendo quantidades crescentes de ACLEC. ACLEC foi incorporada na dieta artificial aos níveis de 1,0 e 2,0% que foi oferecida às larvas. As dietas controle foram suplementadas um peso equivalente de caseína para a quantidade de proteínas extra (ACLEC) adicionada na dieta experimental.

Em todas as concentrações, ACLEC não apresentou efeito significativo na sobrevivência larval (Figura 9A) nem sobre o peso médio das larvas sobreviventes (Figura 9B).

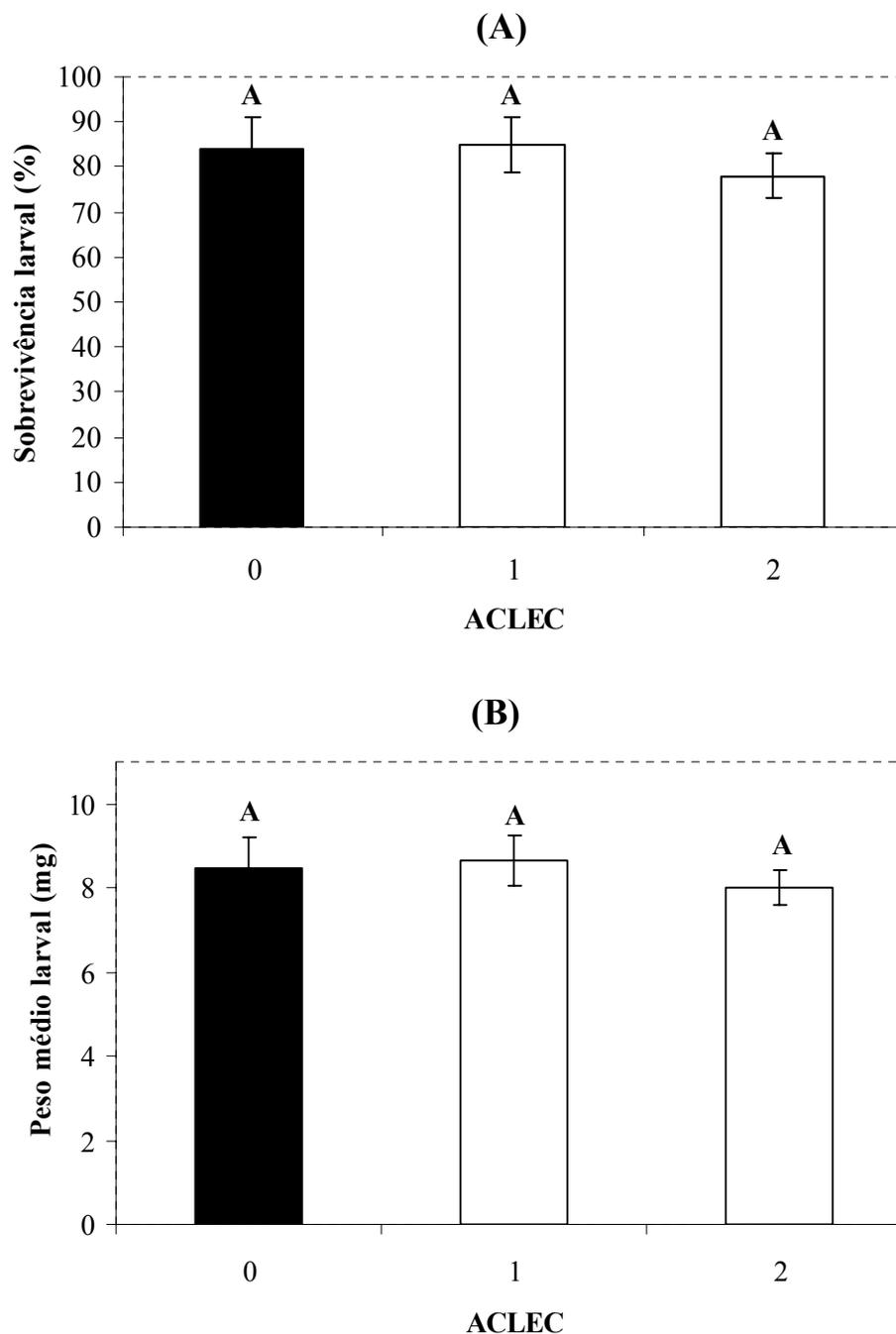


Figura 9: Efeito de ACLEC sobre larvas de *C. cephalonica* alimentadas com dieta artificial. (A) sobrevivência e (B) peso médio larval dos indivíduos sobreviventes. Y interceptando em (A) é a sobrevivência, e (B) é o peso das larvas na dieta controle. Cada valor representa à média \pm S.E. de $n \geq 60$. As barras de erro indicam o erro padrão de cada média. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$; teste de Tukey) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

B) Consumo e utilização de alimento

As Figuras 10 e 11 mostram os efeitos de ACLEC no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas pela larva de *C. cephalonica*. A presença da lectina causou uma diminuição no consumo da dieta e na produção fecal das larvas alimentadas com ACLEC a 2% (Figura 10), promovendo uma redução de 33% e 25%, respectivamente, quando comparada à produção das larvas da dieta controle.

O conteúdo de proteína total dos extratos fecais e do intestino médio das larvas de *C. cephalonica* alimentadas em dietas controle e dietas contendo ACLEC a 2% foi analisado (Figuras 11A e 11B). Pelos dados obtidos, ACLEC não promoveu efeitos significativos nas respectivas análises protéicas.

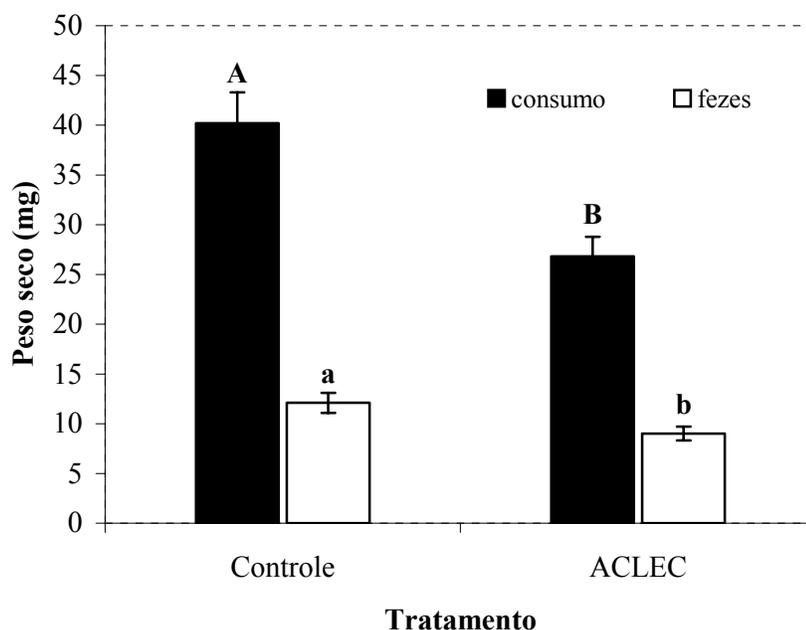


Figura 10: Parâmetros fisiológicos medidos para as larvas de *C. cephalonica*. As larvas foram alimentadas em dietas controle ou dietas contendo ACLEC a 2%. Dieta consumida e produção fecal por larva (mg; baseado pelo peso seco) Cada valor representa à média \pm S.E. de $n \geq 60$. As barras de erro indicam o erro padrão de cada média. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$; teste de Tukey) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

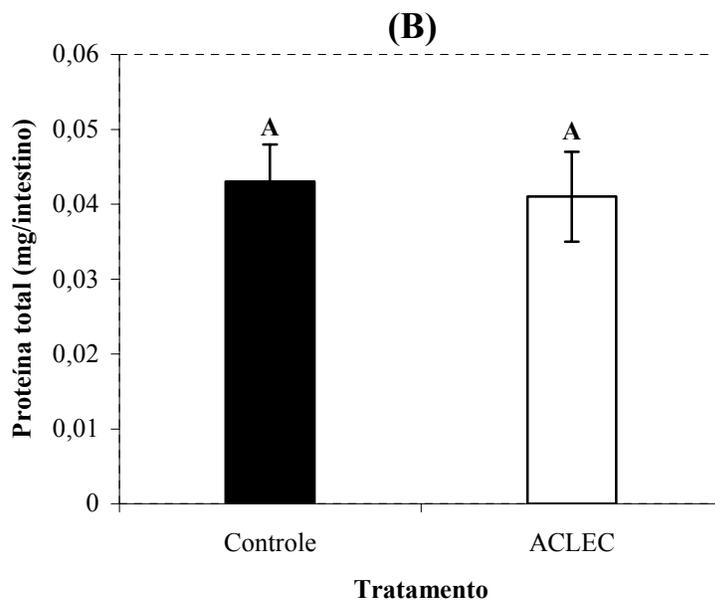
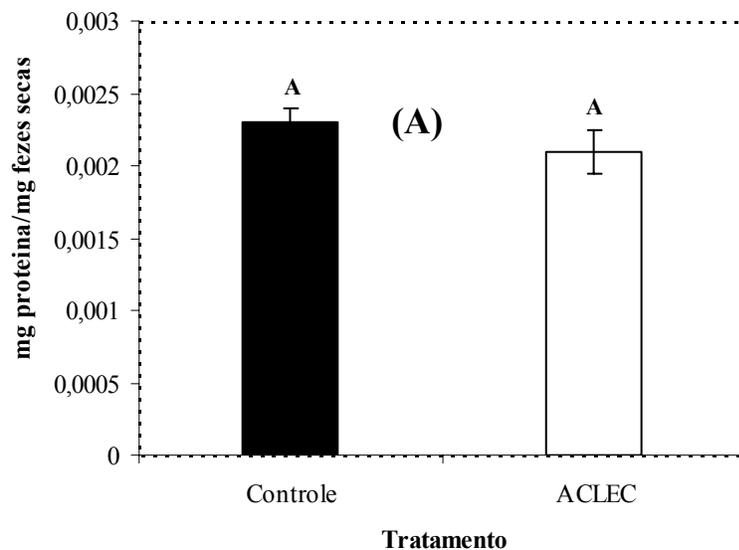


Figura 11: Parâmetros fisiológicos medidos para as larvas de *C. cephalonica*. As larvas foram alimentadas em dietas controle ou dietas contendo ACLEC a 2%. **(A)** Conteúdo de protéico das fezes coletadas das larvas. **(B)** Proteína total nos intestinos médios. Cada valor representa à média \pm S.E. de $n \geq 60$. As barras de erro indicam o erro padrão de cada média. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$; teste de Tukey) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

Os índices nutricionais relacionados na Tabela 4 mostram que as larvas alimentadas com a dieta contendo ACLEC 2% sofreram a influência da lectina no seu metabolismo quando comparadas às larvas alimentadas com a dieta controle.

Tabela 4: Índices nutricionais das larvas do 4º instar de *Corcyra cephalonica* alimentadas em dietas artificiais controle ou contendo ACLEC a 2%. Eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD), digestibilidade aparente (AD) e custo metabólico (CM) das larvas.

<i>Índices nutricionais (mean ± SE)</i>				
Tratamento (%)	ECI (%)	ECD (%)	AD (%)	CM (%)
0,0	23,16 ± 2,5 a	30,2 ± 1,9 a	69,9 ± 5,2 a	69,7 ± 4,5 a
2,0	32,25 ± 3,2 b	50,6 ± 5,08 b	68,7 ± 3,5 a	49,3 ± 2,9 b

Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$; teste de Tukey) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

C) Ação de ACLEC na atividade enzimática das larvas de *C. cephalonica*

As enzimas presentes no intestino médio das larvas alimentadas com dieta controle e com ACLEC tiveram sua atividade avaliada através da hidrólise do substrato BApNA. A Figura 12A mostra que ACLEC a 2% não induziu modificações na expressão das proteinases preexistentes no intestino médio das larvas de *C. cephalonica*, mas uma diminuição significativa de aproximadamente 50% foi observada na atividade proteásica das fezes das larvas alimentadas com ACLEC a 2%.

A Figura 12B ilustra a atividade em gelatina das enzimas do tipo tripsina inibidas por TLCK (aproximadamente 40 e 34 kDa) presentes no IM das larvas alimentadas com dieta controle (linha 1). Quando as larvas foram alimentadas com ACLEC 2%, a atividade enzimática do intestino médio (linha 2) não sofreu modificações, apenas a atividade trípica das fezes (linha 4) apresentou uma diminuição, confirmando os resultados apresentados na Figura 12A. Para confirmar a atividade de enzimas do tipo tripsina, TLCK, um inibidor sintético específico para tripsina, foi incubado com as alíquotas do IM e das fezes das larvas alimentadas com a lectina ou não (dados não mostrados).

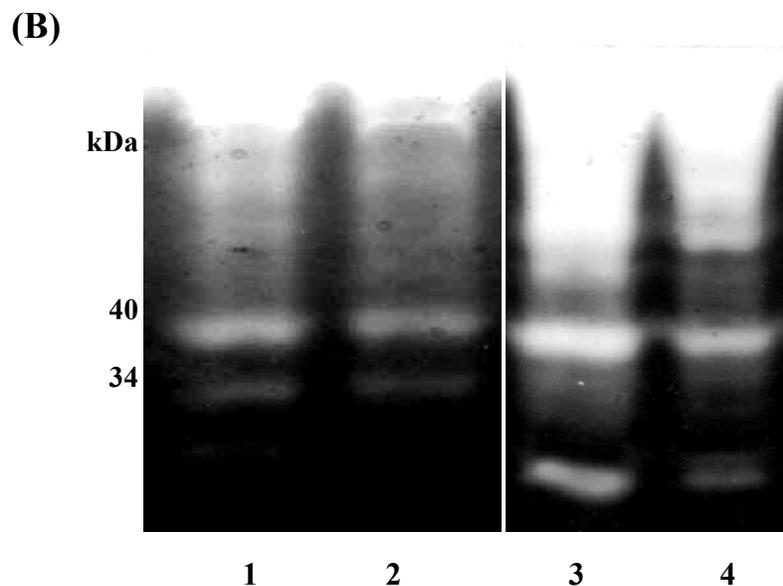
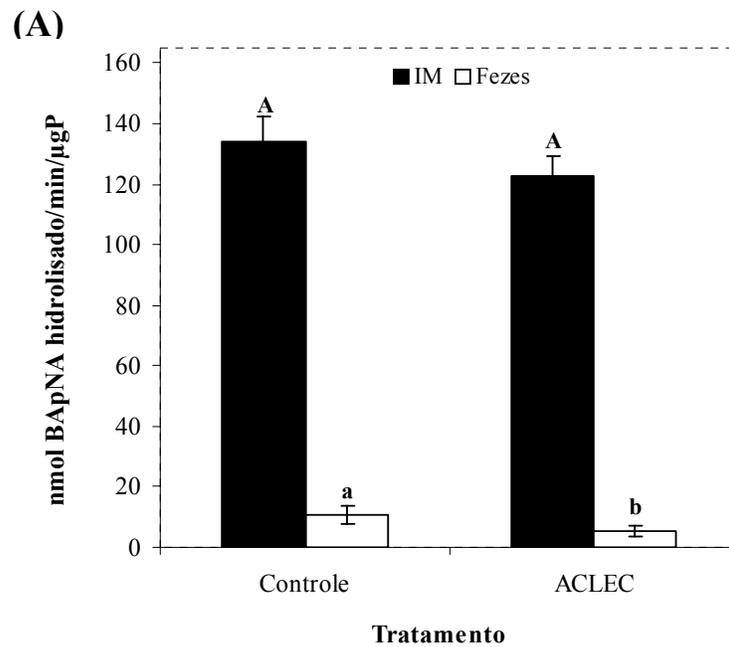


Figura 12: Resposta das proteinases de *C. cephalonica* a ingestão de ACLEC 2%. (A) atividade trípica das enzimas do IM e das fezes. As barras de erros indicam o erro padrão da média. As mesmas letras indicam que não houve diferenças estatisticamente significante ($p > 0,05$, teste de Tukey). **(B)** Ensaio de proteinases após eletroforese em PAGE-SDS (10%): (1) IM de larvas controle, (2) IM de larvas alimentadas com ACLEC 2%, (3) fezes de larvas controle, e (4) fezes de larvas alimentadas com ACLEC 2%. A atividade proteolítica apareceu como uma zona clara contra um fundo azul.

1.2 - Efeito de ACLEC sobre o desenvolvimento larval de *Anagasta kuehniella*

A) Sobrevivência e peso médio das larvas de *A. kuehniella*

O efeito de ACLEC sobre o lepidóptero *A. kuehniella* foi avaliado através da determinação do número de indivíduos (Figura 13A) e o peso médio (Figura 13B) das larvas de 4º instar em dietas artificiais contendo quantidades crescentes de ACLEC. ACLEC foi incorporada na dieta artificial aos níveis de 1,0 e 2,0% que foi oferecida às larvas. As dietas controle foram suplementadas um peso equivalente de caseína para a quantidade de proteínas extra (ACLEC) adicionada na dieta experimental. A sobrevivência e o peso das larvas controle alimentadas na ausência da lectina (representada pela intersecção com o eixo Y) foi ca 88% e 6,8 mg, respectivamente, enquanto que nas dietas artificiais contendo 1,5% e 1,0% de ACLEC produziu cerca de 50% de mortalidade (LD_{50}) e um decréscimo de 50% no peso (ED_{50}). Análises de regressão mostraram que para cada aumento de 0,1% na concentração de ACLEC ocorre um aumento de 3,0% na mortalidade com um R^2 igual a 0,96 enquanto que este mesmo aumento na concentração de ACLEC acarretou um decréscimo de 0,2 mg no peso ($R^2= 0,90$).

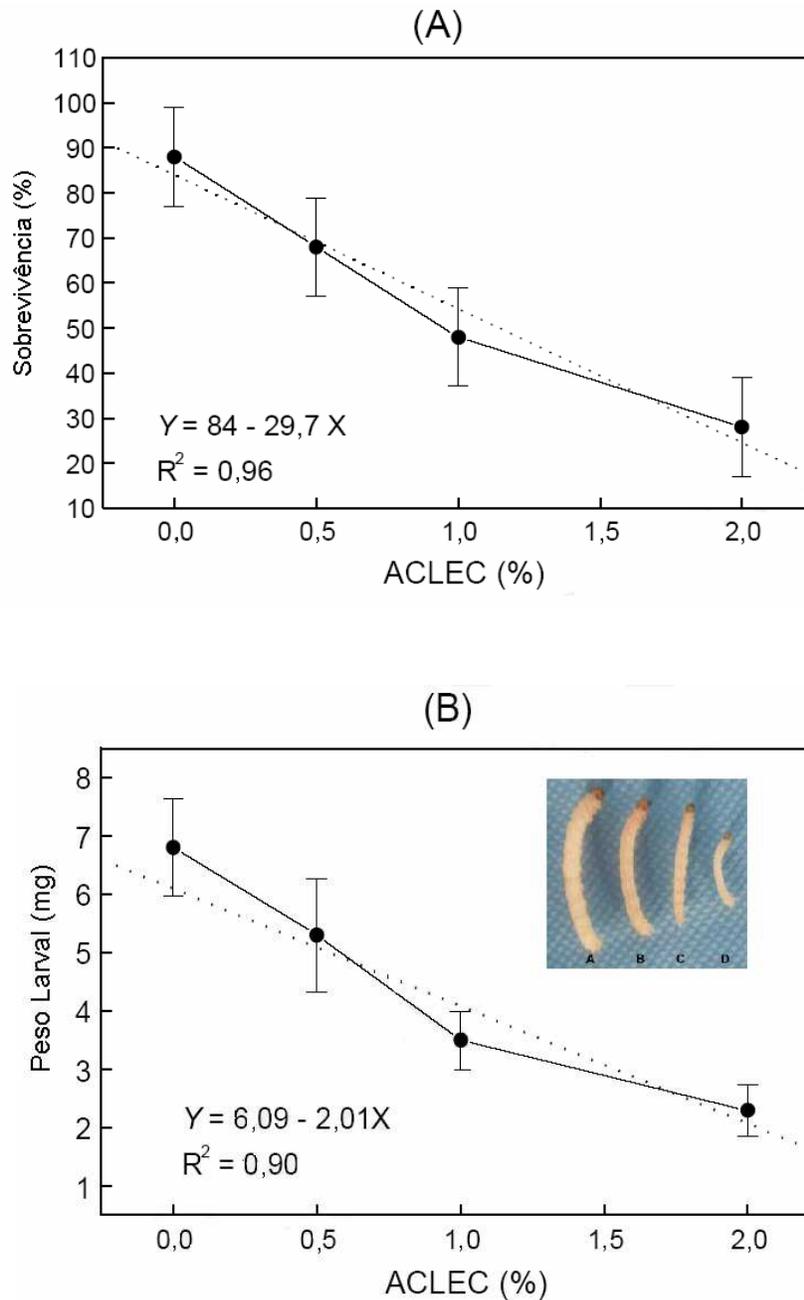


Figura 13: Efeito de ACLEC sobre larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial. (A) sobrevivência e (B) peso médio larval dos indivíduos sobreviventes. Y interceptando em (A) é a sobrevivência, e (B) é o peso das larvas na dieta controle. (Foto) Variação do tamanho das larvas alimentadas com ACLEC e em dietas controle: (A) larvas controle, (B) larvas alimentadas em 0,5%, (C) 1,0% e (D) 2,0%.

C) Consumo e utilização de alimento

As Figuras 14 e 15 mostram os efeitos de ACLEC no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas pela larva de *A. kuehniella*. A presença da lectina causou um efeito significativo no consumo da dieta e na produção fecal das larvas alimentadas com ACLEC a 2% (Figura 14), promovendo uma redução de 28% e 40%, respectivamente, quando comparada à produção das larvas da dieta controle.

O conteúdo de proteína total dos extratos fecais e do intestino médio das larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dietas controle e dietas contendo ACLEC a 2% foi analisado (Figuras 15A e 15B). Pelos dados obtidos, ACLEC promoveu um aumento no conteúdo protéico de aproximadamente 22% nas fezes (Figura 15A) e uma diminuição de aproximadamente 30% no conteúdo de proteína total dos intestinos médios (Figura 15B) das larvas alimentadas com a lectina quando comparadas com as larvas controle.

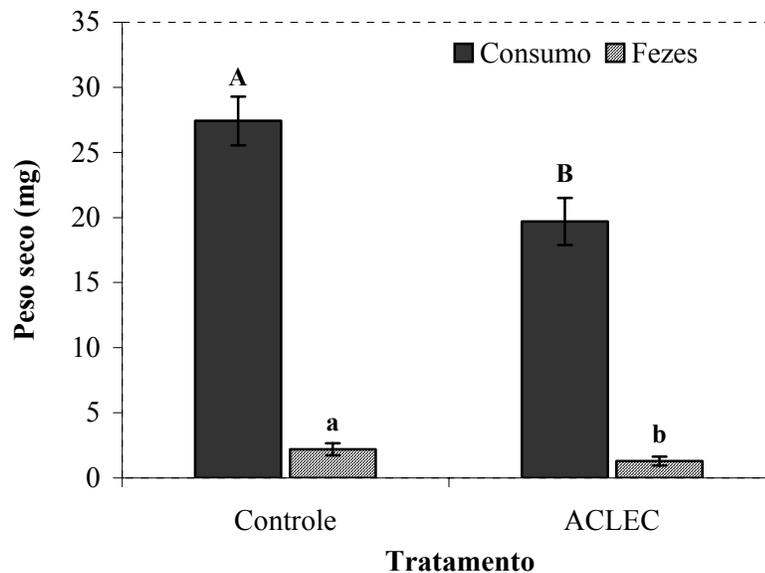


Figura 14: Parâmetros fisiológicos medidos para as larvas de *A. kuehniella*. As larvas foram alimentadas em dietas controle ou dietas contendo ACLEC a 2%. Dieta consumida e produção fecal por larva (mg; baseado pelo peso seco). Cada valor representa à média \pm S.E. de $n \geq 60$. As barras de erro indicam o erro padrão de cada média. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$; teste de Tukey) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

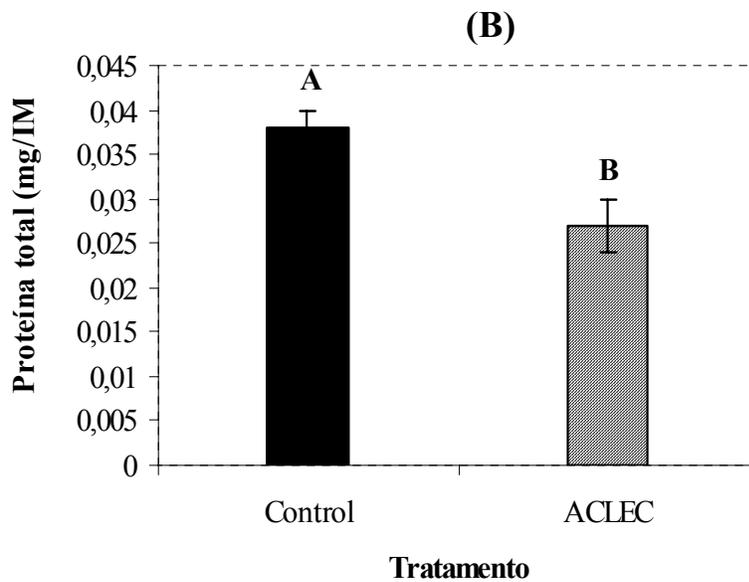
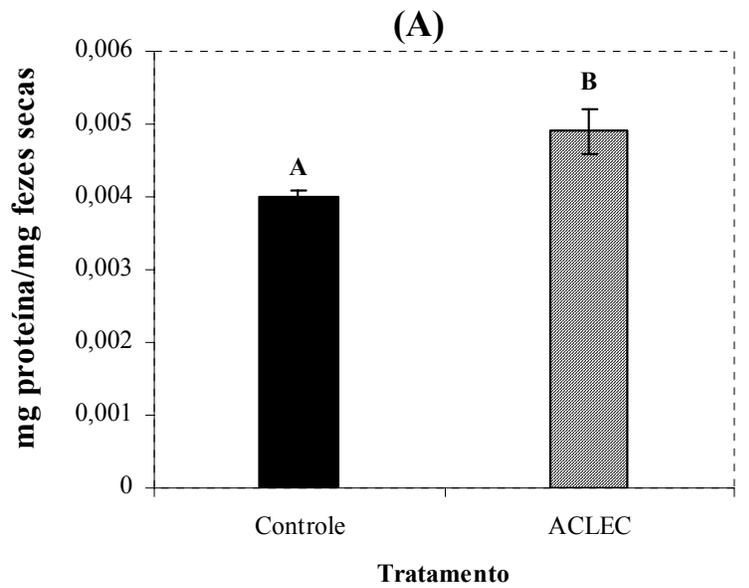


Figura 15: Parâmetros fisiológicos medidos para as larvas de *A. kuehniella*. As larvas foram alimentadas em dietas controle ou dietas contendo ACLEC a 2%. (A) Conteúdo de protéico das fezes coletadas das larvas. (B) Proteína total nos intestinos médios. Cada valor representa à média \pm S.E. de $n \geq 60$. As barras de erro indicam o erro padrão de cada média. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$; teste de Tukey) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

Os índices nutricionais relacionados na Tabela 5 mostram que as larvas alimentadas com a dieta contendo ACLEC 2% sofreram a influência da lectina no seu metabolismo quando comparadas às larvas alimentadas com a dieta controle.

Tabela 5: Índices nutricionais das larvas do 4º instar de *Anagasta kuehniella* alimentadas em dietas artificiais controle ou contendo ACLEC a 2%. Eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD), digestibilidade aparente (AD) e custo metabólico (CM) das larvas.

<i>Índices nutricionais (mean ± SE)</i>				
Tratamento (%)	ECI (%)	ECD (%)	AD (%)	CM (%)
0,0	26,3 ± 3,1 a	28,2 ± 3,0 a	91,8 ± 6,1 a	71,8 ± 5,2 a
2,0	16,8 ± 2,6 b	18,1 ± 1,9 b	93,7 ± 5,5 a	81,9 ± 5,9 b

Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$; teste de Tukey) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

C) Ação de ACLEC na atividade enzimática das larvas de *A. kuehniella*

As enzimas presentes no intestino médio das larvas alimentadas com dieta controle e com ACLEC tiveram sua atividade avaliada através da hidrólise do substrato BApNA. A Figura 16A mostra que ACLEC a 2% promoveu uma diminuição de aproximadamente 34% na atividade trípica do intestino médio e um aumento de aproximadamente 78% na atividade trípica total das fezes das larvas alimentadas com dieta contendo ACLEC 2%.

A Figura 16B ilustra a atividade em gelatina das enzimas do tipo tripsina inibidas por TLCK (aproximadamente 32 e 28 kDa) presentes no IM das larvas alimentadas com dieta controle (linha 1). Quando as larvas foram alimentadas com ACLEC 2%, a atividade enzimática do intestino médio (linha 2) sofreu uma diminuição na atividade trípica e a atividade das fezes (linha 4) apresentou um aumento, confirmando os resultados apresentados na Figura 16A. Para confirmar a atividade de enzimas do tipo tripsina, TLCK, um inibidor sintético específico para tripsina, foi incubado com as alíquotas do IM e das fezes das larvas alimentadas com a lectina ou não (dados não mostrados).

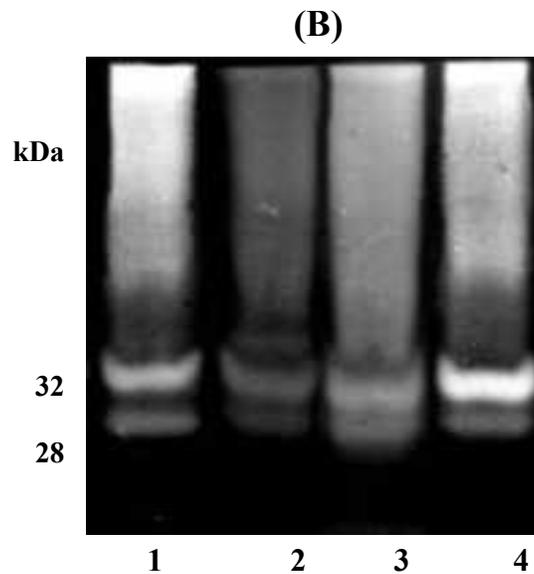
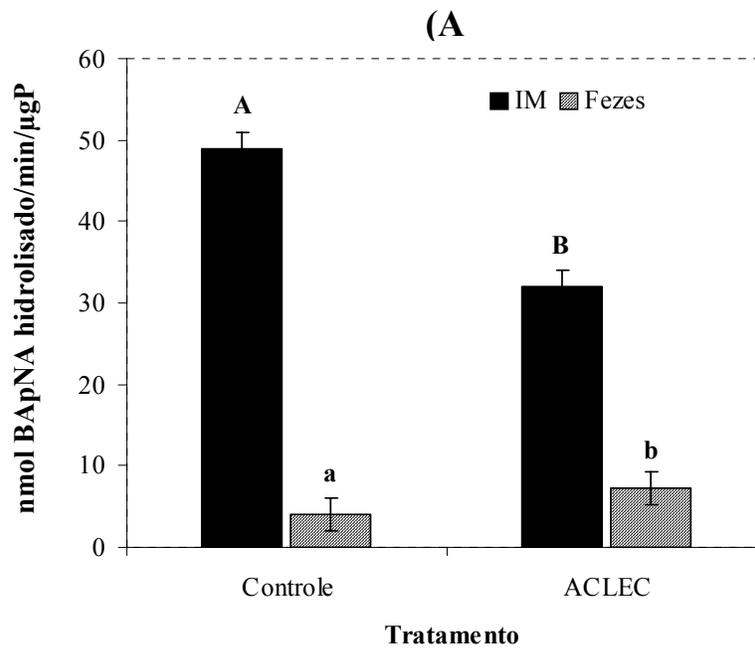


Figura 16: Resposta das proteinases de *A. kuehniella* a ingestão de ACLEC 2%. (A) atividade trípica das enzimas do IM e das fezes. As barras de erros indicam o erro padrão da média. As mesmas letras indicam que não houve diferenças estatisticamente significante ($p>0,05$, teste de Tukey). **(B)** Ensaio de proteinases após eletroforese em PAGE-SDS (10%): (1) IM de larvas controle, (2) IM de larvas alimentadas com ACLEC 2%, (3) fezes de larvas controle, e (4) fezes de larvas alimentadas com ACLEC 2%. A atividade proteolítica apareceu como uma zona clara contra um fundo azul.

1.3 – Cromatografia de afinidade em coluna de quitina

A lectina ACLEC foi submetida a uma cromatografia de afinidade em coluna de quitina. O resultado obtido apresentou a eluição de três picos protéicos, sendo que o primeiro foi obtido pela eluição com tampão de equilíbrio (Tampão Fosfato 50 mM, pH 7,6) e o segundo pico eluído com tampão Acetato de Sódio 100 mM (Figura 17). Um terceiro pico foi eluído com HCl 0,1 M. A atividade hemaglutinante foi detectada em ambos os picos.

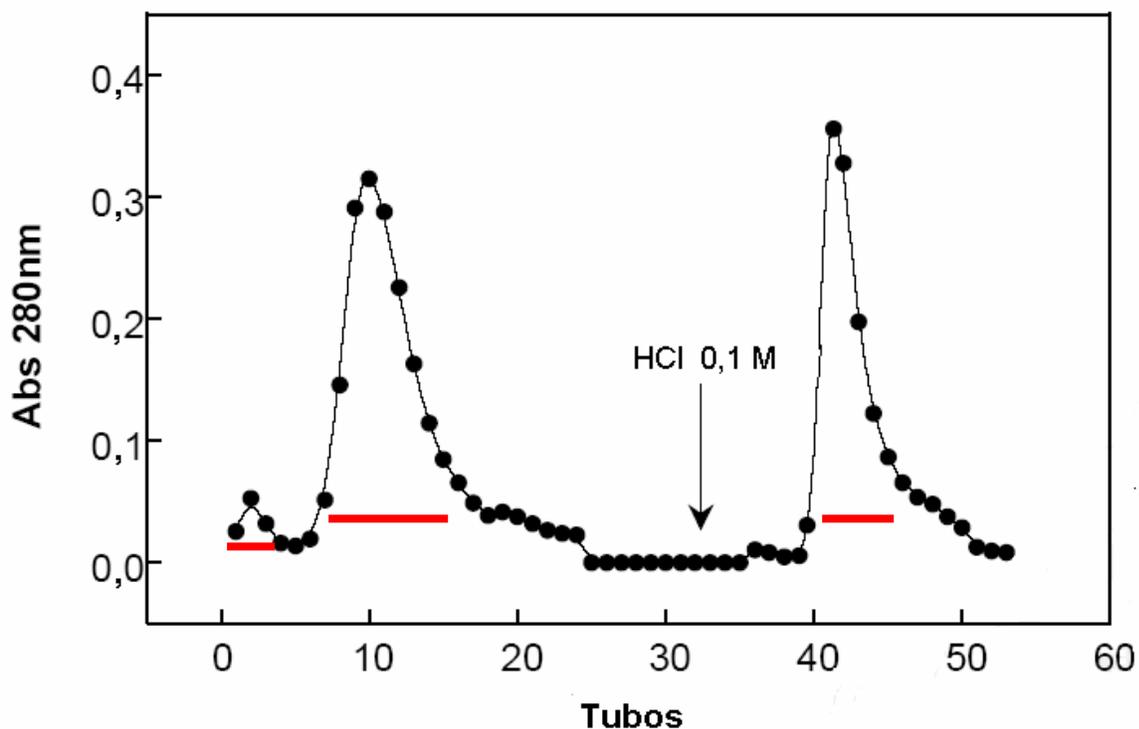


Figura 17: Cromatografia em coluna de quitina da lectina ACLEC. A coluna (2,0 x 6,0 cm) foi submetida a um fluxo de 35 ml/h, eluída inicialmente com tampão fosfato 50 mM e em seguida eluída com HCl 0,1 M; foram coletadas frações de 2,0 ml por tubo. Atividade hemaglutinante (—).

2 - Estudos da atividade pró-inflamatória da lectina isolada de sementes de *Annona coriacea*

2.1 - Migração de neutrófilos e células mononucleares induzida pela lectina de *A. coriacea* para a cavidade peritoneal de camundongos

A administração intraperitoneal de ACLEC (3-100 µg/ cavidade) induziu migração de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos quando comparada com o grupo controle (PBS) (Figura 18A). A curva de tempo revelou que a migração máxima de neutrófilos foi observada há 16 horas ($2,56 \pm 0,3 \times 10^6$ cel./cav.) após a injeção, retornando aos níveis de controle após 72 horas ($0,0172 \pm 0,013 \times 10^6$ cel./cav.) (Figura 18B). A injeção intraperitoneal de ACLEC também aumentou significativamente o número de células mononucleares com uma resposta máxima alcançada com 10 µg/cavidade (19A). A migração de células mononucleares iniciou-se a 48 h após a injeção de ACLEC, mantendo marcadamente elevada até 96 h ($1,97 \pm 0,174 \times 10^6$ cel./cav.) após a injeção (19B). Além dos protocolos experimentais (acima descritos) foram designados para investigas ACLEC (30 µg/cavidade) induziu a migração de neutrófilos a 16 h após a injeção de ACLEC.

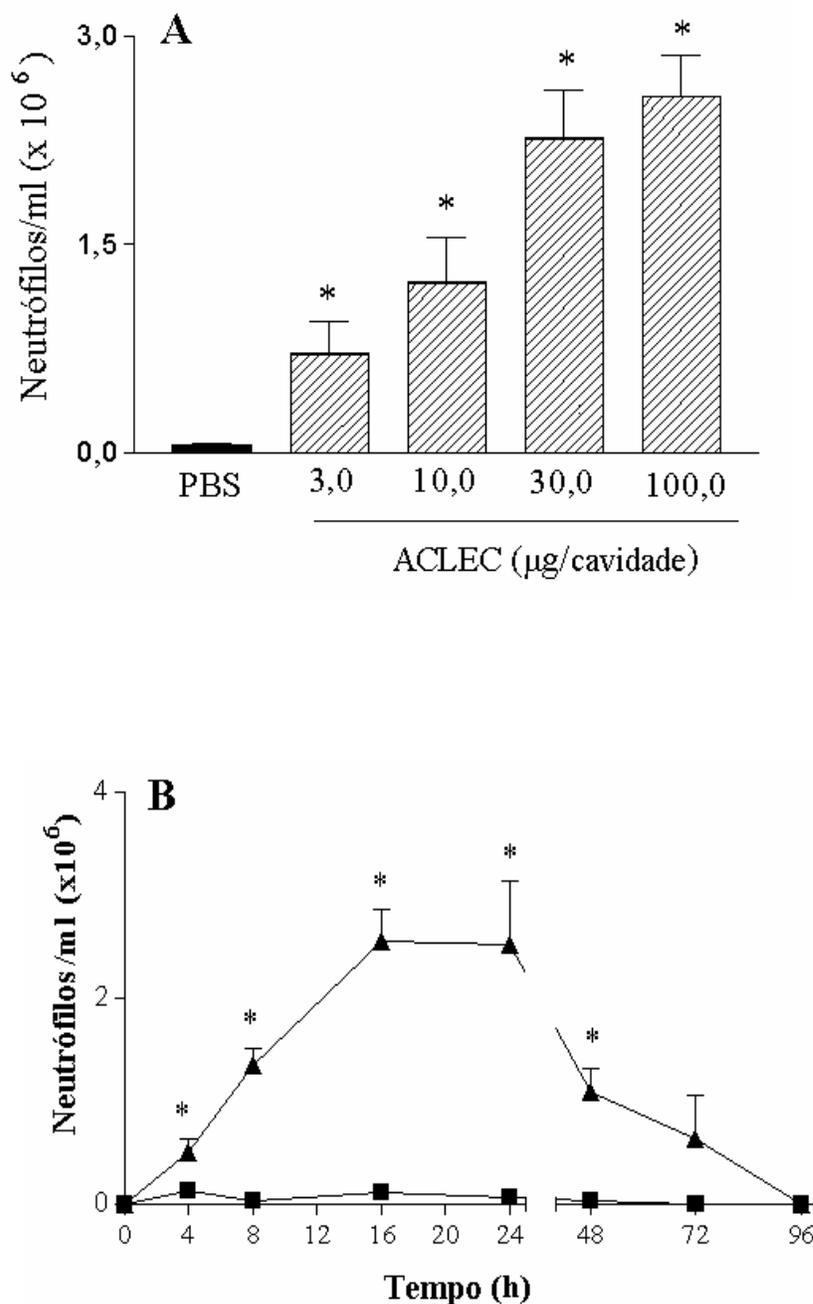


Figura 18: Aumento dose-- e tempo-dependentes no número de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos após a injeção da lectina de *Annona coriacea* (ACLEC). (A) mostra a migração de neutrófilos induzida por ACLEC nos doses indicadas, 16 h após a injeção desta lectina. (B) mostra a cinética de migração de neutrófilos induzida por 100 µg/cavidade de ACLEC. Os dados são as médias dos valores ± s.e.m. de 5 camundongos. * $P < 0,05$ comparado com o respectivo grupo controle.

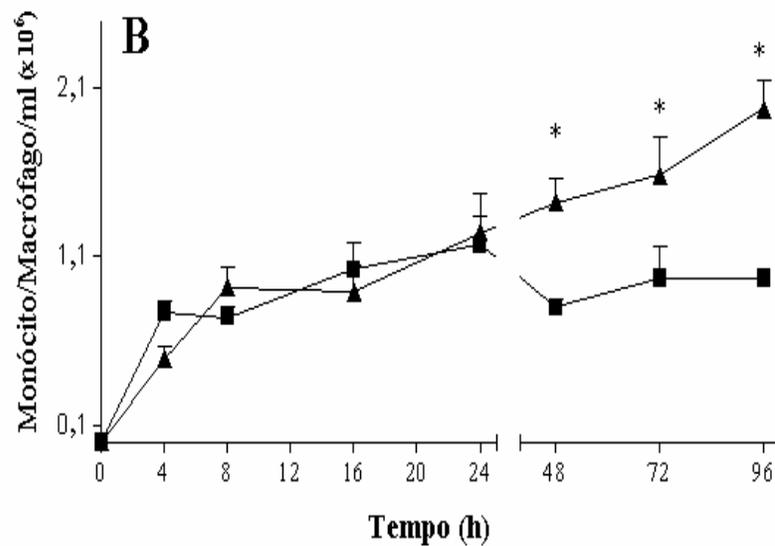
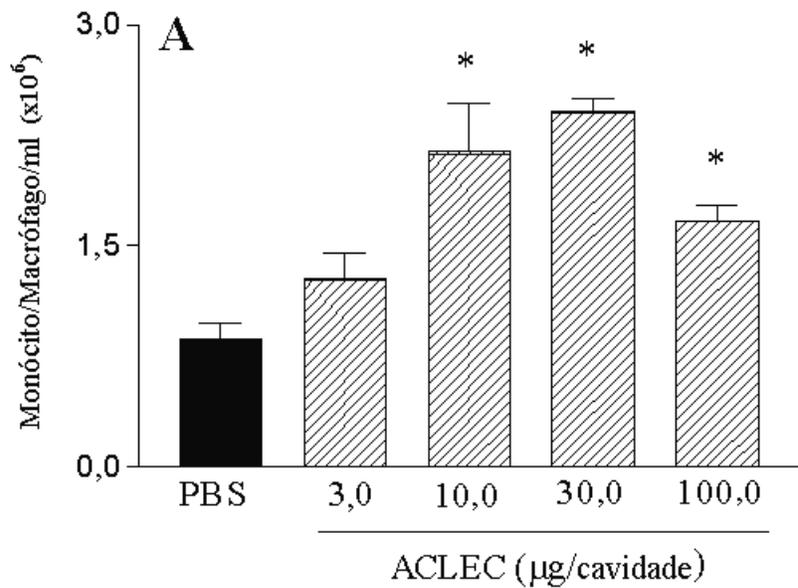


Figura 19: Alterações dose- e tempo-dependentes no número de células mononucleares na cavidade peritoneal de camundongos pós a injeção da lectina de *Annona coriacea* (ACLEC). (A) mostra a migração de células mononucleares induzida por ACLEC nos doses indicadas, 72 h após a injeção desta lectina. (B) mostra a cinética do influxo de células mononucleares na cavidade peritoneal de camundongos após injeção de 100 µg de ACLEC. Os dados são as médias dos valores \pm s.e.m. de 5 camundongos. * $P < 0,05$ comparado com o respectivo grupo controle.

2.2 - Efeito de carboidratos sobre a migração de neutrófilos induzida pela lectina de *A. coriacea*

ACLEC (30 µg) foi diluída em uma solução de D-manose, D-glicose ou Sacarose antes da injeção na cavidade peritoneal dos camundongos. Os carboidratos foram utilizados em uma concentração 100 vezes maior do que a utilizada para as lectinas, em base molar. O carboidrato D-glicose inibiu aproximadamente 52%, enquanto que o carboidrato D-manose inibiu aproximadamente 91% a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal (Figura 20). Quando injetados isoladamente, os três carboidratos não causaram aumento significativo na migração de células.

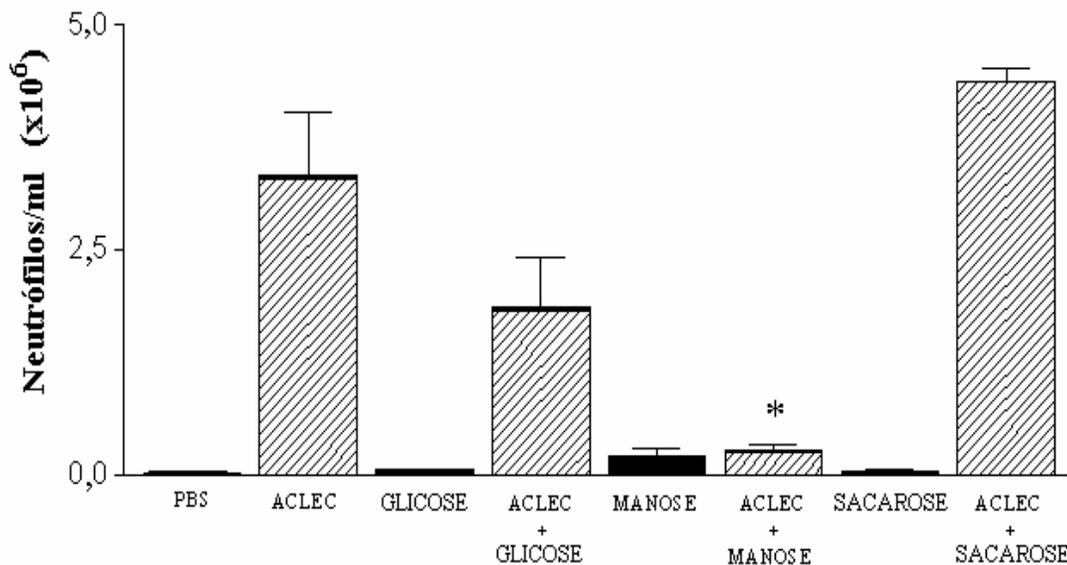


Figura 20: Efeito inibitório dos carboidratos na migração de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos induzida pela lectina de *Annona coriacea* (ACLEC). A migração de neutrófilos foi avaliada 16 h após a injeção de ACLEC (30µg /cavidade) sozinha ou após a incubação com 0,1 M de carboidratos específicos (D-glicose e D-manose) e não específicos (sacarose). As barras em preto representam à migração de neutrófilos induzida pela injeção de carboidratos sozinhos. Os dados são as médias dos valores \pm s.e.m. de 6 camundongos. * $P < 0,05$ comparado com os resultados obtidos nos grupos dos animais os quais receberam ACLEC sem incubação com os carboidratos.

2.3 – Envolvimento de mediadores inflamatórios na migração de neutrófilos induzida pela lectina de *A. coriacea*, para a cavidade peritoneal de camundongos.

Tabela 6 mostra que o tratamento dos animais com dexametasona (0.5 mg/kg, s.c.) causou uma marcante inibição ($P < 0.001$) na migração de neutrófilos induzida por ACLEC. O inibidor seletivo de COX-2 celecoxibe (3 mg/kg, s.c.) e o antagonista do receptor PAF PCA4248 (5 mg/kg, i.v.) também inibiu significativamente ($P < 0.01$) a migração de neutrófilos. Em contraste, o inibidor de lipoxigenase AA861 (0,2 mg/kg, i.v.), o inibidor não seletivo do óxido nítrico sintase L-NAME (20 mg/kg, i.v.), o inibidor seletivo do óxido nítrico sintase induzível Aminoguanidina (75 mg/kg, i.v.), o antagonista do receptor taquicinina NK_1 SR140333 (100 μ g/kg, i.v) e o antagonista do receptor de taquicinina NK_2 SR48968 (1 mg/kg, i.v.) não inibiram significativamente a migração de neutrófilos induzida por ACLEC (Tabela 6).

Tabela 6: Efeito de diferentes agentes farmacológicos no influxo de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos induzida pela lectina de *Annona coriacea* lectin (ACLEC). Dexametasona (0.5 mg/kg), celecoxibe (3 mg/kg), AA861 (0.2 mg/kg), PCA4248 (5 mg/kg), SR140333 (100 µg/kg), SR48968 (1 mg/kg), L-NAME (20 mg/kg) e Aminoguanidina (75 mg/kg) foram administrada como decritas acima. A contagem dos neutrófilos foi realizada a 16 h após a injeção de ACLEC (30 µg/cavidade). Os dados são as medias dos valores \pm s.e.m. da percentagem de neutrófilos de 4-6 camundongos.

Tratamento	Neutrófilos (%)
<i>PBS</i>	9,8 \pm 1,0
<i>ACLEC</i>	56,5 \pm 4,6
<i>ACLEC + DEXAMETASONA</i>	19,8 \pm 5,3 *
<i>ACLEC + CELECOXIBE</i>	32,4 \pm 6,1 *
<i>ACLEC + AA861</i>	54,6 \pm 5,9
<i>ACLEC + PCA 4248</i>	28,5 \pm 5,7 *
<i>ACLEC + SR 140333</i>	52,8 \pm 3,4
<i>ACLEC + SR 48968</i>	44,6 \pm 5,0
<i>ACLEC + L-NAME</i>	50,3 \pm 3,5
<i>ACLEC + AMINO GUANIDINA</i>	41,0 \pm 5,7

*P<0.05, comparado com o grupo não tratado.

VI – DISCUSSÃO

6.1 – ESTUDO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE ACLEC

As sementes das plantas contribuem significativamente para a dieta humana e animal, sendo que as sementes de leguminosas e de cereais perfazem a maior parte desta dieta (Macedo et al., 2003). Desse modo, as plantas são recursos grandiosos de substâncias as quais podem ser utilizadas no desenvolvimento de métodos ambientais seguros para o controle de insetos. Os efeitos deletérios de certos fitoquímicos ou extratos brutos de plantas purificados sobre os insetos são manifestados por vários caminhos, incluindo toxicidade, retardamento do crescimento, inibição da alimentação e redução da fecundidade e fertilidade (Sadek, 2003).

As lectinas são definidas como proteínas ligantes de carboidratos outros do que enzimas ou anticorpos com a propriedade característica de aglutinar sangue ou outras células (Van Damme et al., 1998). Elas estão amplamente distribuídas nas plantas e são frequentemente encontradas em altas concentrações nas sementes de legumes assim como em outros tecidos das plantas. Várias funções têm sido descritas para as lectinas. O papel da maioria das lectinas está associado com sua ligação a glicanos externos tanto no reconhecimento e/ou fenômeno relacionado à defesa. Mais recentemente, têm-se sugerido que as lectinas podem estar envolvidas na regulação celular e na sinalização (Van Damme et al., 2004). A descoberta que as lectinas de plantas exercem significantes efeitos tóxicos ou inibitórios ao crescimento dos insetos sugere que elas possuam um importante papel na defesa das plantas contra o ataque dos insetos (Machuka et al., 1999; Bell et al., 1999; Macedo et al., 2002; Macedo et al., 2003; Macedo et al., 2004).

O uso de lectinas de plantas para interferirem com o crescimento e o desenvolvimento dos insetos que se alimentam de plantas tem sido sugerida como uma estratégia de controle seletivo. Em geral, os níveis de lectinas incorporados nas dietas artificiais para testar a toxicidade oral tem variado de 1 a 50 mg/g de dieta ou de 5 a 1500 mg/ml de dieta para liberar estas proteínas para a mastigação e a sucção dos insetos, respectivamente. Então, os parâmetros os quais indicam os efeitos danosos das lectinas nos insetos incluem o peso larval, tamanho, cor, pupação, mortalidade, inibição da alimentação, efeitos antimetabólicos, níveis de excreção de honeydew, retardo no tempo do desenvolvimento total, emergência dos adultos e/ou

fecundidade na primeira e/ou segunda geração dos insetos os quais tenham sido alimentados em dietas contendo lectina (Vasconcelos & Oliveira, 2004).

O presente estudo foi realizado para examinar a ação da lectina de *A. coriacea* (ACLEC), com propriedades de ligação a manose-glicose (Coelho et al., 2003), no crescimento e na alimentação dos lepidópteros *C. cephalonica* e *A. kuehniella*, assim como analisar se ACLEC possui a capacidade de interromper a capacidade digestiva no intestino médio larval dessas larvas.

A ingestão da lectina ACLEC não causou uma significativa redução na sobrevivência e no peso médio das larvas de *C. cephalonica* (Figura 9A e B) na maior concentração da lectina. Porém, ACLEC teve um forte efeito negativo na sobrevivência e no peso médio das larvas de *Anagasta kuehniella*, com um LD₅₀ e ED₅₀ a 1,5% e 1,0% da lectina (Figura 13A e B). Várias outras lectinas também mostraram atividade inseticida para lepidópteros em diversas concentrações (0,5 – 2,0%). Deste modo, a lectina de sementes de *Koeleria paniculata* (KpLec) quando incorporada em dietas artificiais a 0,65% produziu um LD₅₀ e ED₅₀ a 0,2% (Macedo et al., 2001). Similarmente, a lectina de *Galanthus nivalis* (GNA) foi tóxica contra o inseto *Lacanobia oleracea* a 2,0% (Fitches et al., 1997), e a lectina de ervilhas, *Pisum sativus*, foi detrimental ao inseto *Chilo partellus* a 0,5% (Law e Kfir, 1997).

O mecanismo pelo qual as lectinas exercem seus efeitos tóxicos sobre os insetos está poucos esclarecidos, mas se sabe que as primeiras moléculas que se ligam a “receptores” no epitélio do intestino médio, são as responsáveis pelos efeitos sistêmicos subsequentes (Powell et al., 1998). Outra possibilidade é que as lectinas podem ligar-se a membrana peritrófica na região do intestino médio dos insetos e impedir ou aumentar o movimento entre o espaço endo e exoperitrófico ou evitar a formação da própria membrana (Czapla, 1998). Essa membrana existe em quase todos os insetos fitófagos e é composta principalmente de resíduos de N-acetilglicosamina e proteínas (Richards e Richards, 1997) e tem como função de formar uma barreira de proteção para o epitélio do intestino médio protegendo-o contra partículas abrasivas. As lectinas também podem interferir com as enzimas digestivas acarretando a inibição da digestão dos alimentos e consequente absorção (Zhu et al., 1996).

ACLEC liga-se a coluna de quitina, embora não completamente (Figura 17), e ainda apresenta atividade hemaglutinante. O fato de ACLEC ligar-se parcialmente a quitina poderia

estar relacionado à especificidade da lectina em se ligar a glicose-manose e usualmente não apresenta um domínio específico para quitina. Outras proteínas sem um domínio específico para quitina, mas com atividade inseticida também se ligam a quitina, incluindo vicilinas (Sales et al, 2001), zeatoxina (Macedo et al., 2000) e lectina de *Talisia esculenta* (Freire et al., 2002). O fato de ACLEC apresentar um efeito inseticida a *A. kuehniella* pode estar relacionado à sua propriedade de ligação a coluna de quitina, embora a mesma não apresente efeito inseticida no desenvolvimento de *C. cephalonica*. As lectinas são consideradas exercerem seu efeito tóxico através da ligação a estruturas quitinosas ou a membrana peritrófica, e o efeito diferencial das lectinas tóxicas é devido à variabilidade da composição de açúcares das estruturas quitinosas e/ou membrana peritrófica e das proteínas glicosiladas (Fitches and Gatehouse, 1998; Habibi et al., 2000, Trigueros et al., 2000).

As substâncias antifedantes são costumeiramente classificadas em repelentes (as quais repelem um inseto sem manter o contato com o material), supressantes (a qual suprime e reprime a atividade após o contato) ou deterrentes (as quais impede um inseto de se alimentar após a ingestão do material) (Chapman, 1989).

O influxo alimentar e a utilização do alimento não é apenas um papel crucial para a sobrevivência do inseto, mas, é também responsável pelo estabelecimento desta população na colheita alvo (Singh, 1999). Quanto maior a sobrevivência e desenvolvimento de um inseto na superfície das plantas, maior será o estabelecimento desta população na planta. Desse modo, os efeitos detrimenais tanto de inibidores de serino e cisteinoproteases, vários reguladores de crescimento (IGRs – do inglês insect growth regulators), extratos de plantas (Farag, 1991; Jagannadh e Nair, 1997; Linton et al., 1997; Richter et al., 1997; Bream et al., 1999) e de lectinas (Fitches e Gatehouse, 1997) têm sido analisados para diferentes espécies de insetos através da análise da produção fecal, a redução da ingestão alimenta dos insetos alvo.

ACLEC tem mostrado exercer uma influência sobre o desempenho de *C. cephalonica* e *A. kuehniella* e conseqüentemente na sobrevivência e no peso larval. Vários lepidópteros geralmente compensam a deficiência nutritiva pelo aumento do consumo alimentar (Timmins et al., 1988; Slansky e Wheeler, 1989). Porém, resultados controversos, têm sido obtidos com alguns insetos como *Spodoptera frugiperda*, no qual a seleção alimentar compensatória é dependente da duração da dieta deficiente.

Um efeito detrimental no influxo alimentar e no consumo foi observado nas larvas neonatas dos insetos da espécie *Corcyra cephalonica* (Figura 10) e *Anagasta kuehniella* (Figura 14) quando alimentadas em dieta contendo ACLEC a 2,0%. As larvas de *C. cephalonica* e *A. kuehniella* diminuíram o seu consumo em aproximadamente 33% e 28% respectivamente, e na produção fecal de aproximadamente 25% (Figura 10A) e 40% (Figura 14), respectivamente. Uma diminuição no consumo em resposta ao efeito tóxico de certa proteína ou aleloquímico na alimentação é comum (Bernard e Lagadic, 1993). Porém, apenas nas larvas de *A. kuehniella* alimentadas com ACLEC a 2% foi observada um aumento na concentração de proteína fecal (22%) (Figura 15A), e uma redução do conteúdo total protéico do intestino médio de 30% (Figura 15B). Estes resultados observados nas larvas de *A. kuehniella* alimentadas com a dieta contendo ACLEC podem ser devido ao efeito da lectina, ou seja, ACLEC pode estar bloqueando a absorção de nutrientes ou modificando a atividade proteásica dos insetos de modo que o inseto tenha que aumentar o consumo alimentar devido ao reduzido conteúdo protéico do alimento (Slansky Jr. And Wheeler, 1992). Assim, ACLEC não apresenta efeito antifedante para a larva *A. kuehniella*.

Uma confirmação dessa possibilidade é os dados apresentados nas Tabelas 4 e 5, onde os valores de AD das larvas do 4º instar de *C. cephalonica* e *A. kuehniella* foram extremamente constantes durante todo o período de alimentação do experimento, indicando que as larvas tratadas aparentemente absorvem os nutrientes do intestino com a mesma eficiência como os insetos alimentados com as dietas controle (Bernard e Lagadic, 1993).

A mais importante avaliação da utilização alimentar é: eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD) em biomassa. Diferentes compostos têm a capacidade de reduzir a utilização alimentar de várias espécies de insetos assim como a Azadiractina (extrato de *Azadirachta indica*) sobre larvas de *Ostrinia nubilalis* (Arnason et al., 1985) e *Heliothis virescens* (Barnby e Klocke, 1987). De acordo com os resultados ilustrados na literatura, os impactos de ACLEC na eficiência metabólica dos insetos *C. cephalonica* e *A. kuehniella* foram determinados. As larvas de *A. kuehniella* consumiram menos dieta, ganhou menos peso e foi menos eficiente na converção do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD) em biomassa quando comparado com a eficiência das larvas controle (Tabela 5). Esta significativa redução nos valores de ECI (16,8%) e de ECD (18,1%) indica que a maior parte da

dieta foi metabolizada em energia e a menor parte foi convertida em biomassa (Sadek, 2003). Para confirmar estes resultados, na Tabela 5 podemos observar um aumento de 81,9% no custo metabólico (CM) dessas larvas, assim como descrito por Mordue e Blackwell (1993). Podemos sugerir que a redução no ECD o qual é provavelmente o resultado de um aumento na proporção da energia assimilada é desviada do crescimento para compensar os custos metabólicos associados com a detoxicação e disposição de ACLEC. Tal situação tem sido frequentemente observada em lagartas alimentadas com dietas diluídas (Timmins et al., 1988; Slansky e Wheeler, 1989) ou dietas contendo azadiractina (Ramachandran et al., 1989; Timmins e Reynolds, 1992). Desse modo, podemos sugerir que o tempo e a energia requerida para estabelecer um sistema enzimático eficiente para detoxicar ACLEC reduziu a quantidade de alimento ingerido que poderia ser convertido em biomassa, assim reduzindo a eficiência do processo de conversão tanto quanto no ganho de peso e o crescimento larval, e conseqüentemente aumentando o tempo necessário para alcançar o peso final para completar os instar (Bernard e Lagadic, 1993). A redução nos índices nutricionais é tida como uma evidência do forte efeito tóxico da pós-ingestão (Xie e Isman, 1992; Wheeler e Isman, 2001). Porém, as larvas de *C. cephalonica* tiveram maiores eficiências de utilização (ECI e ECD) em dietas contendo ACLEC a 2,0% (Tabela 4), sugerindo que os altos valores de ECI e ECD seja um efeito compensatório, desde que as larvas consumiram muito menos alimento do que as larvas da dieta controle e desse modo, tiveram uma redução do custo metabólico de aproximadamente 49,3% comparado com o custo metabólico das larvas controle.

Os estudos dos efeitos das lectinas sobre as cisteinoproteases tripsina-like estão sendo documentados, como observado em experimentos utilizando larvas de *Lacanobia oleracea* e como dieta concentrações crescente da lectina de GNA (lectina de *Galanthus nivalis*) ou Con A (lectina de *Canavalia ensiformis*), onde podemos observar um aumento da atividade da tripsina-like solúvel no intestino larval (Fitches e Gatehouse, 1998). Neste estudo mostramos a análise da atividade de tripsina-like nas fezes e fluido intestinal tanto das larvas do inseto *C. cephalonica* como de *A. kuehniella* alimentadas com dietas contendo ACLEC a 2,0%. ACLEC não promoveu modificações significativas nos níveis de tripsina do intestino, apenas um decréscimo de 50% da atividade tríptica das fezes das larvas de *C. cephalonica* (Figura 12A) quando comparadas com as larvas controle. Diferentemente, ACLEC apresenta um efeito na

atividade tripsina-like solúvel de *A. kuehniella*, onde podemos observar uma diminuição dos níveis de tripsina de aproximadamente 34% no fluido intestinal e um aumento de atividade de 78% nas fezes produzidas (Figura 16A e 16B). Estes resultados sugerem que ACLEC possa estar afetando o mecanismo de reciclagem para esta enzima. Estes dados podem ser comprovados através do elevado nível de proteínas encontrados no intestino médio das larvas de *A. kuehniella*, o qual pode parcialmente estar refletindo uma acumulação da lectina juntamente com a sua ligação aos tecidos do intestino, podendo assim induzir o aumento da atividade tripsina (Fitches and Gatehouse, 1998).

Numerosos estudos têm mostrado uma forte correlação entre as proteínas do intestino e os níveis de proteinases luminal nos insetos (Lehane, 1977; Houseman et al, 1985; Billingsley e Hecker, 1991), e este mecanismo pode levar a duas hipóteses: 1) o mecanismo secretório/prandial pode estar operando (Lehane et al. 1995) ou 2) a ligação lectínica pode ter afetado indiretamente nos mecanismos enzimáticos regulatórios como uma consequência da perturbação da membrana peritrófica (Fitches e Gatehouse, 1998), restringindo o movimento bidirecional dos nutrientes e das enzimas digestivas através dos poros da membrana peritrófica, levando a privação nutricional (Eisemann et al., 1994).

Assim, podemos concluir que os experimentos utilizando dietas artificiais contendo ACLEC influencia o crescimento larval, o consumo e a eficiência de conversão das larvas da *A. kuehniella*. Os mecanismos pelos quais as lectinas podem estar exercendo seus efeitos tóxicos nos insetos ainda é pobremente entendido, mas presumivelmente, as propriedades inseticidas estão ligadas as propriedades de ligação a carboidratos dessas proteínas (Czapla e Lang, 1990). Porém, os possíveis mecanismos podem ser: 1) ligação a glicoconjugados na superfície de células epiteliais ao longo do trato intestinal inibindo a obtenção de nutrientes; 2) ligação às enzimas glicosiladas provavelmente inibindo sua ação; 3) ligação a estruturas quitinosas do intestino médio dos insetos (Firmino et al., 1996); 4) resistência a digestão por proteinases dos insetos (Eisemann et al., 1994; Powell et al., 1998), ou 5) por disrupção da função ou da integridade resultando na morte ou atraso no desenvolvimento. Desse modo, as interações das lectinas com o epitélio intestinal pode ser um modelo adequado para os estudos de transferências de moléculas através da barreira biológica, tal como na pesquisa de vírus ou inseticidas alvo. Assim como no desenvolvimento de novas tecnologias na incorporação de

genes em uma variedade de cultivares, o que hoje tem aumentado o interesse na identificação de genes de plantas que conferem resistência à insetos, e na manutenção desses genes para aumentar a capacidade de defesa de plantas contra insetos (Macedo et al., 2000). Obtendo assim, o emprego de lectinas para a produção de plantas transgênicas visando o controle de pragas e gerando uma alternativa para o uso de pesticidas químicos (Jouanin et al., 1998).

6.2 – ESTUDO DA ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA DE ACLEC

Muitas são as evidências que apontam o envolvimento de proteínas ligadoras de carboidratos mediando o reconhecimento em uma grande variedade de sistemas biológicos. Nos últimos anos, tem sido ressaltada a importância dos carboidratos nos mecanismos envolvidos na interação entre células em uma grande variedade de fenômenos biológicos. Sendo assim, a capacidade que as lectinas possuem de interagir especificamente com carboidratos, transformaram estas proteínas em valiosas ferramentas para variadas linhas de pesquisas biológicas e conseqüentemente o campo de estudo e aplicabilidade destas moléculas tem crescido intensamente.

Na resposta inflamatória aguda ocorre o recrutamento de neutrófilos do sangue para o tecido injuriado, onde estão envolvidos processos complexos e multimediados, que ocorrem através de interações seqüenciais entre os neutrófilos e células endoteliais e componentes da matriz extracelular. O controle destes mecanismos envolve a ativação de receptores presentes nas células endoteliais e sanguíneas bem como a expressão de glicoproteínas que medeiam a adesão na membrana celular (McEver, 1992).

Vários dados da literatura com lectinas vegetais, têm demonstrado que lectinas possuem a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos murinos e humanos, estimular macrófagos e mastócitos, induzir migração de neutrófilos, além de apresentarem também, quando administrada endovenosamente, propriedades antiinflamatórias (Assreuy et al., 2002).

Neste estudo mostramos que a lectina de *Annona coriacea* (Coelho et al., 2003) induz um marcante influxo de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos com uma máxima resposta a 16 h e 24 h (Figura 18B), decaindo em seguida. A infiltração de neutrófilos foi seguida por um aumento na contagem de células mononucleares na cavidade peritoneal, iniciando a 48 h (Figura 19B), e mantendo-se elevada 96 h após a injeção. Devido à maioria das atividades das lectinas depender do reconhecimento específico célula-carboidrato, foi examinado os efeitos de diferentes carboidratos na migração induzida por ACLEC (Figura 20). O carboidrato D-mannose, após incubação com a lectina, acentuadamente reduziu a migração de neutrófilos induzida por ACLEC. Estes dados são semelhantes aos encontrados em estudos anteriores que demonstram que este mesmo carboidrato foi capaz de inibir a migração de

neutrófilos induzida por lectinas purificadas de sementes de *Artocarpus integrifolia* (Santos de Oliveira et al., 1994), *Talisia esculenta* (Freire et al., 2003) e *Pisum arvense* (Alencar et al., 2005). Outros carboidratos tais como glicose e galactose inibiram o influxo de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos em resposta a lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora* (Bento et al., 1993), *Glycine max* (Benjamin et al., 1997) e *Vatairea macrocarpa* (Alencar, et al., 2003). Assim, as diferenças na habilidade dos carboidratos em inibir a indução de neutrófilos pode estar relacionadas a diferentes afinidades de uma dada lectina para com os grupos glicosil presentes na superfície das células.

A migração de neutrófilos através do endotélio em direção aos sítios de inflamação presentes nos tecidos envolve diferentes mediadores os quais podem ser liberados de células residentes e de células infiltradas. As funções dos neutrófilos são também dependentes da expressão de moléculas tais como as selectinas L, P e E, assim como ICAM-1 expressas tanto nos neutrófilos ou nas células endoteliais (Simon e Green, 2005). Além disso, numerosos processos bioquímicos estão envolvidos nas interações entre proteínas-carboidratos que ocorrem em diferentes tipos de células tais como linfócitos, macrófagos e mastócitos (Lis and Sharon, 1986; Lima et al., 1999; Andrade et al., 1999a; Barbosa et al., 2001; Coelho-Castelo, et al., 2002; Schlick, et al., 2005). Acredita-se que estas interações sejam sinalizadoras nestas células promovendo a liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como citocinas, óxido nítrico e mediadores lipídicos. Os glicocorticóides têm mostrado suprimir várias funções de neutrófilos por inibir a liberação de mediadores quimiotáticos dos neutrófilos e/ou expressão de certas enzimas inflamatórias chaves induzíveis, tais como COX-2 e iNOS (Adcock and Barnes, 2004). Portanto, os resultados ilustrados na Tabela 6 mostraram que a migração de neutrófilos induzida por ACLEC foi quase abolida em camundongos pré-tratados com dexametasona, o que é consistente com investigações prévias com outras lectinas (Benjamin et al., 1997; Alencar et al., 2003). Além disso, o resultado mostrando que a indução do influxo de neutrófilos promovido por ACLEC foi marcadamente reduzida pelo inibidor seletivo de COX-2 celecoxibe indicando que PGE₂ representa um importante papel nesta resposta inflamatória. O fator de ativação plaquetária (PAF) é um outro quimioatrativo lipídico bem conhecido para neutrófilos (Pettersen and Adler, 2002; Zouki, et al., 1999). Neste estudo, o antagonista do receptor PAF PCA4248 significativamente inibiu a migração de neutrófilos induzida por

ACLEC indicando um maior papel para este mediador lipídico. Interessantemente, as conclusões que PGE₂ e PAF apresentam um importante papel na migração de neutrófilos induzida por ACLEC contrastam com prévios estudos onde o inibidor não seletivo COX indometacina e o antagonista do receptor PAF BN50730 não inibiram o efeito do influxo dos neutrófilos peritoneais induzidos pela lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* (Alencar et al., 2003). Neste estudo em particular, o carboidrato galactose melhor do que D-manose inibiu as respostas induzidas por neutrófilos, o que reforça o fato de que o reconhecimento específico célula-carboidrato é fundamental para determinar a via inflamatória alvo estimulada por diferentes lectinas.

Os leucotrienos são liberados da maioria das células inflamatórias, e o leucotrieno B₄ (LTB₄) em particular exerce uma ação quimiotática potente *in vivo* e *in vitro* para as células polimorfonucleares (Nicosia et al., 2001). Porém, LTB₄ pode não participar na migração celular induzida pela lectina de planta desde que o inibidor de lipoxigenase tal como AA861 (em nosso estudo) e Mk886 (Alencar et al., 2003) falharam em reduzir o recrutamento de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos induzido por ACLEC.

O Óxido nítrico é reconhecido como o maior mediador inflamatório em várias condições e a produção constitutiva de óxido nítrico (NO) é essencial para regular os numerosos processos na microvasculatura, incluindo o controle do tráfego de leucócitos para os tecidos inflamatórios. O óxido nítrico é continuamente produzido pelas células endoteliais através de uma isoforma da enzima NO sintase expressa constitutivamente. A inibição desta enzima induz o recrutamento dos leucócitos para os tecidos, mesmo na ausência de estímulos inflamatórios adicionais. Durante algumas respostas inflamatórias, quando o recrutamento de leucócitos está ocorrendo muito acelerado, observa-se que a NO sintase induzível está superexpressa, embora a habilidade de iNOS derivada do óxido nítrico regular o recrutamento de leucócitos inflamatórios ainda esteja pouco entendida (Hickey et al., 2001). Embora as lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora*, *Pisum arvense* e *Canavalia ensiformes* (concanavalina A) tenham sido capazes de estimularem a síntese de NO por células peritoneais murino isoladas (Andrade et al., 1999b), nenhum estudo tem focado no papel de NO mediando às respostas inflamatórias *in vivo* induzidas por lectinas de plantas. Consequentemente, foi utilizado L-NAME (um inibidor não seletivo de NOS) e aminoguanidina (um inibidor de

iNOS) para estudar o envolvimento do óxido nítrico na migração de neutrófilos induzida por ACLEC. Porém, os dados obtidos mostraram que, nem L-NAME nem aminoguanidina afetaram significativamente as respostas induzidas por ACLEC, mas também não são claros para eliminar o envolvimento do óxido nítrico neste fenômeno.

A neurocinina substância P, neurocinina A e neurocinina B são os principais neuropeptídeos envolvidos nas respostas inflamatórias neurogênicas, atuando via interação com os receptores NK₁, NK₂ e NK₃, respectivamente (Liu and Bucher, 2005). A substância P liberada das fibras-C sensoriais têm mostrado atrair neutrófilos *in vivo* e *in vitro* (O'Connor et al., 2004), mas nenhum estudo prévio tem explorado este mecanismo considerando as respostas inflamatórias induzidas por lectinas de plantas. Para avaliar se os neuropeptídeos liberados de neurônios sensoriais estão envolvidos nas respostas induzidas por ACLEC, os antagonistas seletivos dos receptores NK₁ e NK₂, SR14333 e SR48968, respectivamente, foram testados. O pré-tratamento de camundongos tanto com SR140333 ou SR48968 falhou em reduzir a migração de neutrófilos induzida por ACLEC, assim descartando a participação de tais neuropeptídeos.

Em conclusão, o presente estudo mostra que a lectina de sementes de *Annona coriacea* (ACLEC) é capaz de atrair neutrófilos e células mononucleares na cavidade peritoneal de camundongos. A migração de neutrófilos em resposta a ACLEC foi mostrada ser dependente de sua interação com o reconhecimento específico de resíduos de manose presentes nas células, induzindo principalmente a liberação de mediadores derivados de COX-2 e PAF. Nossas descobertas sugerem que ACLEC pode ser uma ferramenta útil para o entendimento e delineamento dos mecanismos envolvidos nas respostas inflamatórias induzidas por lectinas.

VII - BIBLIOGRAFIA

- Adcock, I.M., Ito, K., Barnes, P.J., 2004. Glucocorticoids: Effects on gene Transcription. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **1**: 247-254.
- Alencar, N. M. N.; Assureuy, A. M. S.; Alencar, V. B. M.; Melo, S. C.; Ramos, M. V.; Cavada, B. S.; Cunha, F. Q.; Ribeiro, R. A., 2003. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 1674-1681.
- Alencar, V.B.M., Assreuy, A.M.S., Alencar, N.M.N., Meireles, A.V.P., Mota, M.R.L., Aragão, K.S., Cajazeiras, J.B., Nagano, C.S., Brito, G.A.C., Silva, L.I.M.M., Pinto, V.P.T., Sampaio, A.H., Debray, H., Cavada, B.S., Ribeiro, R.A., 2005. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces in-vivo and in-vitro neutrophil migration. *Pharmacy and Pharmacology* **57**: 375-381.
- Andrade, A.F.B., Saraiva, E.M.B., 1999a. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. *Parasitol. Res.* **85**: 576-581.
- Andrade, J.L., Arruda, S., Barbosa, T., Paim, L., Ramos, M.V., Cavada, B.S., Barral-Neto, M., 1999b. Lectin-Induced nitric oxide production. *Cellular Immunology* **194**: 98-102.
- Arnason, J.T., Philogène, B. J. R., Donskov, N., Hudon, M., McDougall, C., Fortier, G., Morand, P., Gardner, D., Lambert, J., Morris, C., Nozzolillo, C., 1985. Anti-feedant and insecticidal properties of azadirachtin to European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Entomol. Exp. Appl.* **38**: 29.
- Assreuy, A. M. S.; Calvete, J. J.; Alencar, N. M. N.; Cavada, B. S.; Rocha-Filho, D. R.; Melo, S. C.; Cunha, F. Q.; Ribeiro, R. A., 2002. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. *Biology of Reproduction* **67**(6): 1796-1803.
- Assreuy, J.; Cunha, F. Q.; Epperlein, M.; Noronha-Dutra, A.; O'Donell, C. A.; Liew, F. Y.; Moncada, S., 1994. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.* **24**(3): 672-676.
- Barbosa, T., Arruda, S., Cavada, B., Grangeiro, T. B., Freitas, L. A. R., Barral-Neto, M., 2001. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the *Diocleinae* Subtribe. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **96**: 673-678.
- Barnby, M. A., Klocke, J. A., 1987. Effects of azadirachtin on the nutrition and development of tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabr.) (Noctuidae). *J. Insect Physiol.* **33**: 69.
- Bell, H. A.; Fitches, E. C.; Down, R. E.; Marris, G. C.; Edwards, J. P.; Gatehouse, A. M. R., 1999. The effect of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Physiol.* **45**: 983-991.
- Bem-Baruch, A.; Michiel, D. F.; Oppenheim, J. J., 1995. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J. Biol. Chem.* **270**(20): 11703-11706.

- Benjamin, C.F., Figueiredo, R.C., Henriques, M.G.M.O., Barja-Fidalgo, C., 1997. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **30**: 873-881.
- Bento, C. A. M.; Cavada, B. S.; Oliveira, J. T. A.; Moreira, R. A.; Barja-Fidalgo, C., 1993. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. *Agents Actions* **38**: 48-54.
- Bernard, L., Lagadic, L., 1993. Sublethal effects of dietary cyfluthrin on nutritional performance and gut hydrolase activity in larvae of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Pesticide Biochemistry Physiology* **46**: 171-180.
- Bevilacqua, M. P.; Nelson, R. M.; Mannori, G.; Cecconi, O., 1994. Endothelial-leukocyte adhesion molecule in human disease. *Annu. Rev. Med.* **45**: 361-378.
- Billingsley, P. F., Hecker, H., 1991. Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Díptera: Culicidae); activity and distribution of trypsin, aminopeptidase and alpha glucosidase in the midgut. *Journal of Medical Entomology* **28**: 865-871.
- Bischoff, S. C.; Brunner, T.; Weck, A. L.; Dahinden, C. A., 1990. Interleukin-5 modifies histamine release and leukotriene generation by human basophils in response to diverse agonists. *J. Exp. Med.* **172**: 1577-1582.
- Bream, A. S.; Ghoneim, K. S.; Mohamed, H. A., 1999. Food metabolic changes in larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) induced by tebufenozide. *Bull. Ent. Soc. Egypt. Econ. Ser.* **26**: 11-24.
- Butcher, E. C., 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) to specificity and diversity. *Cell* **67**: 1033-1037.
- Carlini, C. R.; Grossi-de-Sá, M. F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* **40**: 1515-1539.
- Carlini, C. R.; Udedible, A. B., 1997. Comparative effects of processing methods on hemagglutinating and antitryptic activities of *Canavalia ensiformes* and *Canavalia brasiliensis*. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 4372-4377.
- Chao, C.; Jensen, R.; Daily, M. O., 1997. Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells. *J. Immunol.* **159**: 1686-1694.
- Chapman, R. F.; Berneys, E.A., 1989. Insect behavior at leaf surface and learning as aspects of host plant selection. *Experientia* **45**: 215-222.
- Claes B, Dekeyser R, Villarroel R, Van den Bulcke M, Bauw G, Van Montagu M, Caplan A, 1990. Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. *Plant Cell* **2**: 19-27.
- Coelho, M.B., Freire, M.G.M., Toyama, M.H., Marangoni, S., Novello, J.C., Macedo, M.L.R., 2003. Purification and characterization of a lectin from *Annona coriacea* seeds. *Protein and Peptide Letters* **10**: 165-173.
- Coelho-Castelo, A. A. M., Panunto-Castelo, A., Moreno, A. N., Dias-Baruffi, M., Jamur, M. C., Oliver, C., Roque-Barreira, M. C., Rodrigues, V., 2002. Sm-60, a mannose-binding

- protein from *Schistosoma mansoni* with inflammatory property. *Int. J. Parasitol.* **32**: 1747-1754.
- Contran; R. S.; Robbins, S. L., 2000. Patologia Estrutural e Funcional. Guanabara, 6^a ed.
- Costa, S.K.P., Esquisatto, L.C.M., Camargo, E., Gambero, A., Brain, S.D., DeNucci, G., Antunes, E., 2001. Comparative effect of *Phoneutria nigriventer* spider venom and capsaicin on the rat paw oedema. *Life Sciences* **69**: 1573-1585.
- Cronstein, B. N.; Weissman, G., 1993. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis and Rheumatism* **136**(2): 142.
- Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H., 1986. The release of a neutrophil factor from peritoneal macrophage by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. *Eur. J. Pharmacol.* **129**(1-2): 65-76.
- Czapla, T.H., Lang, B. A., 1990. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and South Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* **83**: 2480-2485.
- Dale, M. M.; Foreman, J. C., 1989. Introduction to immunology and pathology of host defense mechanisms. In: *Textbook of Immunopharmacology*. Dale, M. M. and Foreman, J. C. (Eds), Blackwell scientific Publications, 401-411.
- Dias-Baruffi, M.; Roque-Barreira, M. C.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H., 1995a. Isolation and partial chemical characterization of macrophage derived neutrophil chemotactic factor. *Mediators Inflammation* **4**: 52-54.
- Dias-Baruffi, M.; Roque-Barreira, M. C.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H., 1995b. Biological characterization of a homogeneous fraction of purified macrophage derived neutrophil chemotactic factor. *Mediators Inflammation* **4**: 55-57.
- Diaz, C.; Melchers, L. S.; Hooykas, P. J. J.; Lugtenberg, B. J. J.; Kijne, J. W., 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature* **338**: 579-581.
- Doherty, N. S.; Janusz, M. J., 1994. Neutrophil proteases: their physiological and pathological roles. In: *Handbook of immunopharmacology*. Hellewell, P. G. and Williams, T. J. (Eds). Academic Press, 55-94.
- Duffy, A. J.; Nolan, B.; Sheth, K.; Collette, H.; Mita, D.; Bankey, P. E., 2000. Inhibition of alveolar neutrophil immigration in endotoxemia is macrophage inflammatory protein 2 independent. *J. Surg. Res.* **90**: 51-57.
- Eiseman, C. H., Donaldson, R. A., Pearson, R. D., Cadogan, L. C., Vuocolo, T., Tellam, R. L., 1994. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. *Entomologia Experimentalis Applicata* **72**: 1-10.
- Frag, A. I., 1991. Inhibition of feeding rates and utilization efficiency in *Spodoptera littoralis* larvae by two compounds with anti-ecdysone activity. *Ann. Agric. Sc.* **29**: 609-621.
- Filliatre, L.G., Sayah, S., Latournerie, V., Renaud, J.F., Finet, M., Hanf, R., 2001. Cyclooxygenase and lipoxygenase pathways in mast cell dependent-neurogenic inflammation

- induced by electrical stimulation of the rat saphenous nerve. *Br. J. Pharmacol.* **132**: 1581-1589.
- Firmino, F.; Fernandes, K. V. S.; Sales, M. P.; Gomes, V. M.; Miranda, M. R. A.; Domingues, S. J. S.; Xavier-Filho, J., 1996. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structure in the midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**: 749-756.
- Fitches, E., Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A., 1997. Effects of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on the development of the tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae in laboratory and glasshouse trials. *Journal of Insect Physiology* **43** (8): 727-739.
- Fitches, E.; Gatehouse, J. A.; 1998. A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). *J. Insect Physiol.* **44**: 1213-1224.
- Fitches, E.; Woodhouse, S. D.; Edwards, J. P.; Gatehouse, J. A., 2001. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*, Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. *J. Insect Physiol.* **47**: 777-787.
- Franco, O. L.; Ridgen, D. J.; Melo, F. R.; Grossi-de-Sá, M. F., 2002. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylase structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.* **269**: 397-412.
- Franco-Penteado, C. F., Desouza, I., Teixeira, S. A., Ribeiro-DaSilva, G., De Nucci, G., Antunes, E., 2001. Role of nitric oxide on the increased vascular permeability and neutrophil accumulation induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse paw. *Biochemical Pharmacology* **61**: 1305-1311.
- Freire, M. G. M.; Gomes, V. M.; Corsini, R. E.; De Simone, S. G.; Novello, J. C.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R., 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 61-68.
- Freire, M. G. M.; Machado, O. L. T.; Smolka, M. B.; Marangoni, S.; Novello, J. C.; Macedo, M. L. R., 2001. Isolation and characterization of isolectins from *Talisia esculenta* seeds. *J. Protein Chem.* **20**: 495-500.
- Freire, M.G.M., Desouza, I.A., Silva, A.C.M., Macedo, M.L.R., Lima, M.S., Tamashiro, W.M.S.C., Antunes, E., Marangoni, S., 2003. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. *Toxicon* **42**: 275-280.
- Garcia, V. A., Freire, M. D. M.; Novello, J. C.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R., 2004. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: Purification, characterization, and activity against pest proteases. *Protein Journal* **23** (5): 343-350.
- Habibi, J., Backus, E. A.; Huesing, J. E., 2000. Effects of phytohemagglutinin (PHA) on the structure of midgut epithelial cells and localization of its binding sites in western tarnished plant bug, *Lygus hesperus* Kinght. *J. Insect Physiol.* **46**: 611-619.

- Hackman, R. H.; Kabat, E. A., 1969. New substrates for use with chitinases. *Anal. Biochem.* **8**: 397-401.
- Haruta, M.; Major, I. T.; Christopher, M. E.; Patton, J. J.; Constabel, C. P., 2001. A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. *Plant Mol. Biol.* **46**: 347-359.
- Hickey, M.J., Granger, D.N., Kubes, P., 2001. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions: studies in iNOS-deficient mice. *Acta Physiol Scand* **173**: 119-126.
- Higgs, G.A., Vane, J.R., 1983. Inhibition of cyclo-oxygenase and lipoxygenase. *British Medical Bulletin* **39**: 265-270.
- Houseman, J. G., Downe, A. E. R., Morrison, P. E., 1985. Similarities in digestive proteinase production in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) and *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Insect Biochemistry* **15**: 471-474.
- Imanishi S, Kito-Nakamura K, Matsuoka K, Morikami A, Nakamura K, 1997. A major jasmonate-inducible protein of sweetpotato, ipomoelin, is an ABA-independent wound-inducible protein. *Plant Cell Physiol* **38**: 643-52.
- Inoue, H., Asaka, T., Nagata, N., Koshihara, Y., 1997. Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. *European Journal Pharmacology* **333**: 231-240.
- Jagannadah, V., Nair, V. S. K., 1997. Food consumption and utilization by diflubenzuron treated larvae of *Spodoptera mauritia* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Pl. Protec. Sci.*: 40-43.
- Johnston, B.; Kubes, P., 1999. The α_4 -integrin: and alternative pathway to neutrophil recruitment? *Immunol. Today* **20**(12): 545-560.
- Jongsma, M. A.; Bolter, C., 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.* **43**: 885-895.
- Jouanin, L.; Bonade-Bottino, M.; Girard, C.; Morrot, G.; Giband, M., 1998. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci.* **131**: 1-11.
- Kennedy, J. F.; Palva, P. M. G.; Corella, M. T. S.; Cavalcanti, M. S. M.; Coelho, L. C. B. B., 1995. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polym.* **26**: 219-230.
- Kieda, C., 1998. Role of lectin-glycoconjugate recognitions in cell-cell interactions leading to tissue invasion. *Adv. Exp. Med. Biol.* **435**: 75-82.
- Klimp, A. H.; Vries, E. G. E.; Scherphof, G. L.; Daemen, T. A., 2002. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **44**(2): 143-161.
- Kubes, P., 1995. Microvascular permeability alterations and the role of nitric oxide. Em: Kubes, P. (ed). Nitric oxide: A molecular of cell-cell interaction in the microcirculation. R. G. Landes Company p. 75-97.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Law, I. J., Kfir, R., 1997. Effect of mannose-binding lectin from peanut and pea on the stem borer *Chilo partellus*. *Entomologia Experimentalis Applicata* **82**: 261-265.
- Lehane, M. J., 1977. An hypothesis of the mechanism controlling proteolytic digestive enzyme production levels in *Stomoxys calcitrans*. *Journal of Insect Physiology* **23**: 713-715.
- Lehane, M. J., Blakemore, S., Williams, S., Moffat, M.R., 1995. Mini Review: Regulation of digestive enzyme levels in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology B* **110** (2): 285-289.
- Liew, F. Y.; McInnes, I. B., 2001. The role of innate mediators in inflammatory response. *Mol. Immunol.* **38**: 887-890.
- Lima, J. E., Sampaio, A. L. F., Henriques, M. G. M. O., Barja-Fidalgo, C., 1999. Lymphocyte activation and cytokine production by *Pisum sativum* agglutinin (PSA) *in vivo* and *in vitro*. *Immunopharmacology* **41**: 147-155.
- Linton, Y. M., Nisbet, A. J.; Mordue, A. J. (Luntz), 1997. the effect of azadirachtin on the testes of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.) *J. Insect Physiol.* **43**: 1077-1084.
- Lis, H., Sharon, 1986. Biological properties of lectins. In: Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J. (Eds.), *The Lectins. Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, Academic Press, London, pp. 266–276.
- Lis, H.; Sharon, N., 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* **98**: 637-674.
- Liu, L., Burcher, E., 2005. Tachykinin peptides and receptors: Putting amphibians into perspective. *Peptides* **26**: 1369-1382.
- Lord, J. M., et al., 1994. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.* **8**: 201-208.
- Lorenzi, H., 1992. *Árvores Brasileira – Manual de Identificação e Cultivo de plantas nativas do Brasil*. Editora plantum LTDA: 1.
- Loris, R.; Hamelryck, T.; Bouckaert, J.; Wyns, L., 1998. Legume lectins structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1383**: 9-36.
- Macedo, M. L. R.; Coelho, M. B.; Freire, M. G. M.; Machado, O. L. T.; Marangoni, S.; Novello, J. C., 2000. Effect of a toxic protein isolated from *Zea mays* seeds on the development and survival of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28**: 183-190.
- Macedo, M. L. R.; Fernandes, K. V. S.; Sales, M. P.; Xavier-Filho, J., 1995. Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which are susceptible or resistant to the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **26**: 183-190.
- Macedo, M. R. L.; Freire, M. G. M.; Cabrini, E. C.; Toyama, M. H.; Novello, J. C.; Marangoni, S., 2003. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effects on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochem. Biophys. Acta* **1621**: 170-182.

- Macedo, M. L. R.; Freire, M. G. M.; Martins, L. T. D. M.; Martinez, D. S. T.; Gomes, V. M.; Smolka, M. B.; Toyama, M. H.; Marangoni, S.; Coelho, L. C. B. B., 2004a. Novel Protein from *Labramia bojeri* A. DC. Seeds Homologue to Kunitz-Type Trypsin Inhibitor with Lectin-like Properties. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 7548-7554
- Macedo, M. L. R.; Freire, M. G. M.; Castro, M. M., 2004b. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), *Arch. Insect Biochem. Physiology* **56**: 84-96.
- Macedo, M. R. L.; Mello, G. C.; Freire, M. G. M.; Novello, J. C.; Marangoni, S., Matos, D. G. G., 2002. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus* larval. *Plant Physiol. Bioch.* **40**: 891-898.
- Machuka, J., Okeola, O. G., Van Damme, J. M., Chrispeels, M. J., Van Leuven, F., Peumans, W. J., 1999. Isolation and partial characterization of new galactose-specific lectins from African yam beans *Sphenostylis stenocarpa* Harms. *Phytochemistry* **51**: 721-728.
- Majno, G., 1985. inflammatory mediators: where are they going? *Inflammatory Mediators*. Higgs, G. A. and Williams, T. J. (Eds). MacMillan, 1-6.
- McEver, R. P., 1992. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr. Biol.* **4**: 840-849.
- Medzhitow, R.; Janeway, J. C. A., 1997. Innate immunity: impact of the adaptive immune response. *Curr. Op. Immunol.* **9**: 4-9.
- Mello, M. O.; Silva-Filho, M. C., 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Braz. J. Plant Physiol.* **14**(2): 71-81.
- Michaud, D.; Faye, L.; Yalle, S., 1993. Eletrophoresis análisis of plant cysteine and serine proteinases using gelatin-containing polyacrilamide gels and class-specif proteinase inhibitors. *Electrophoresis* **14**: 94-99.
- Mitchell, R. A.; Bucala, R., 2000. Tumor growth-promoting properties of macrophages migration inhibitory factor (MIF). *Sem. Cancer Biol.* **10**: 359-366.
- Moncada, S.; Palmer, R. M. J.; Higgs, E. A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142.
- Moraes, S. M. D.; Cavada, B.S.; Moreira, R. A.; Roque-Barreira, M. C.; Santos-de-Oliveira, R.; Pinto, V. P. T.; Oliveira, J. T. A., 1996. Purification, physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* forma *aurantiaca* seeds. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29** (8): 977-985.
- Moreira, R. A.; Barros, A. C. H.; Stewart, J. C.; Pusztai, A., 1983. Isolation and characterization of a lectin from seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). *Planta* **158**: 63-69.
- Mordue (Luntz), A. J., Blackell, A., 1993. Azadirachtin: an update. *Journal of Chemical Ecology* **15** (1): 121-128.
- Nakagawa R, Yasokawa D, Okumura Y, Nagashima K, 2000. Cloning and sequence analysis of cDNA coding for a lectin from *Helianthus tuberosus* callus and its jasmonate-induced expression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 1247-54.

- Nicosia, S., Capra, V., Rovati, G.E., 2001. Leukotrienes as Mediators of Asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. **14**, 3-19.
- Nishida, R., 2002. Sequestration of defensive substance from plants by Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **47**: 57-92.
- O'Connor, T. M., O'Connell, J., O'Brien, D., Goode, T., Bredin, C. P., 2004. The role of substance P in inflammatory disease. *Journal of Cellular Physiology* **201**: 167-180.
- Oliani, S. M.; Lim, L. H. K.; Chistian, H. C.; Pell, K.; Das; A. M.; Perretti, M., 2001. Morphological alteration of peritoneal mast cell and macrophages in the mouse peritoneal cavity during the early phases of an allergic inflammatory reaction. *Cell. Biol. Int.* **25**(8): 795-803.
- Paes, N. S.; Gerhardt, I. R.; Coutinho, M. V.; Yokoyama, M.; Santana, E.; Harris, N.; Chrispeels, M. J.; Grossi-de-Sá, M. F., 2000. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. *J. Insect Physiol.* **46**: 393-402.
- Peiser, L.; Mukhopadhyay, S.; Gordon S., 2002. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Op. Immunol.* **14**: 123-128.
- Peters, W., 1992. Peritrophic membranes. In *Zôo physiology* vol. 30, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Petterson, C.A., Adler, K. B., 2002. Airways inflammation and COPD: Epithelial-neutrophil interactions. *Chest.* **121**: 142-150
- Peumans, W. J.; Van Damme, E. J. M., 1995. The role of lectins in plant defence. *Histochem. J.* **27**: 253-271.
- Peumans, W. J.; Van Damme, E. J. M., 1998. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* **15**: 199-229.
- Powell, K. S.; Spence, J.; Bharathi, M.; Gatehouse, J. A.; Gatehouse, A. M. R., 1998. Immunohistochemical and development studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal.). *J. Insect Physiol.* **44**: 529-539.
- Pusztai, A.; Bardocz, S., 1996. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. *Trends Glycosci. Glyc.* **8**: 149-165.
- Ramachandran, R., Mukherjee, S. N., Sharma, R. N., 1989. Effect of food deprivation and concentration of azadirachtin on the performance of *Achoea janata* and *Spodoptera litura* on young and mature leaves of *Ricinus communis*. *Entomol. Exp. Appl.* **51**: 29.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M., 1996. *Pharmacology*. 3^a Ed., Churchill Livingstone, cap. **11**, p. 214-245.
- Ribeiro, R. A.; Flores, C. A.; Cunha, F. Q.; Ferreira, R. A., 1991. Il-8 *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. *Immunol.* **73**: 472-477.
- Richards, A. G., Richards, P. A., 1997. The peritrophic membranes of insects. *Ann. Rev. Entomol.* **22**: 219-240.

- Richter, K.; Bohm, G. A.; Kleeberg, H., 1997. Effect of NeemAzal, a natural azarachtin-containing preparation on *Periplaneta Americana* (L.) (Orthoptera: Blattidae). *J. App. Entomol.* **121**: 59-64.
- Robbins, M. C., 1996. Patologia estrutural e funcional. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Rocha, E.; Silva, M., 1978. A brief history of inflammation. In: *Handbook of experimental pharmacology*. Vane, J. R. and Ferreira, S. H. (eds). Springer-Verlag, 6-25.
- Rossi, A. G.; Hellewell, P. G., 1994. Mechanism of neutrophil accumulation in tissues. In: *Handbook of immunopharmacology*. Hellewell, P. G. and Williams. T. J. (Eds). Academic Press, London, 223-243.
- Rüdiger, H., 1998. Plant lectin – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.* **161**: 130-152.
- Sadek, M. M., 2003. Antifeedant and toxic activity of *Adhatoda vasica* leaf extract against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *J. Appl. Ent.* **127**: 396-404.
- Sales, M. P.; Gerhardt, I. R.; Grossi-de-Sá, M. F.; Xavier-Filho, J., 2000. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? *Plant Physiol.* **124**: 515-522.
- Sales, M. P.; pimenta, P. P.; Paes, N. S., Grossi-de-Sá, M. F.; Xavier-Filho, J., 2001. Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleóptera: Bruchidae) larvae. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**: 27-34.
- Santos-de-Oliveira, R., Dias-Baruffi, M., Thomaz, S.M., Beltramini, L.M., Roque-Barreira, M.C., 1994. Neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *Journal of Immunology* **153**: 1798-1807.
- Schlick, K. H., Udelhoven, R.A., Strohmeyer, G. C., Cloninger, M.J., 2005. Binding of manose-functionalized dendrimers with Pea (*Pisum sativum*) lectin. *Molecular Pharmaceutics* **4**: 295-301.
- Scriber, J. M.; Slansky Jr., F., 1981. The nutritional ecology of immature insects. *Ann. Rev. Entomol.* **26**: 183-211.
- Sedgwick, A. D.; Willoughby, D. A., 1985. Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: *Handbook of inflammation*. Bonta, I. L.; bray, M. A. and Parnham, M. J. (Es). Elsevier, 27-47.
- Sharma, H. C.; Sharma, K. K.; Seetharama, N.; Ortiz, R., 2000. Prospects for using transgenic resistance to insects in crop improvement. *Eletronic Journal of Biotechnology* **3**(2): 76-95.
- Sharon, N., 1977. Lectins. *Sci. Amer.* **236**: 108-119.
- Sharon, N.; Lis, H., 1990. Legume lectins – a large family of homologous proteins. *FASEB Journal* **4**: 3198-3208.
- Sharon, N.; Lis, H., 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**: 53R-62R.

- Silva, C. P.; Terra, W. R.; Grossi de Sá, M. F.; Samuels, R. I.; Isejima, E. M.; Bifano, T. D.; Almeida, J. S., 2001. Induction of digestive α -amylase in larvae of *Zabrotes subsfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α -amylase inhibitor 1. *J. Insect Physiol.* **47**: 1283-1290.
- Simon, S. I., Green, C.E., 2005. Molecular mechanisms and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu. Rev. Biomed Eng.* **7**, 151-185.
- Singh, A. K., 1999. Growth and induction in food consumption of *Helicoverpa armigera* Hbn. (Lep., Noctuidae) larvae on chickpea, soybean, and maize diets. *J. Appl. Ent.* **123**: 335-339.
- Slansky Jr., F., Wheeler, G. S., 1989. Compensatory increases in food consumption and utilization efficiencies by velvetbean caterpillars mitigate impact of diluted diets in growth. *Entomol. Exp. Appl.* **51**: 175.
- Slansky Jr., F.; Wheeler, G. s., 1992. Caterpillars compensatory feeding response to diluted nutrients leads to toxic allochemicals dose. *Entomol. Exp. Appl.* **65**: 171-186.
- Souza, G. E. P.; Cunha, F. Q.; Mello, R.; Ferreira, S. H., 1988. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is induced by macrophage depletion. *Agents Actions* **24**: 377-380.
- Springer, T. A., 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* **76**: 301-314.
- Terra, W. R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **47**: 47-61.
- Terra, W. R.; Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* **109B**: 1-62.
- Timmins, W. A., Bellward, K., Stamp, A. J., Reynolds S. E., 1988. Food intake, conversion efficiency, and feeding behaviour to tobacco hornworm caterpillars given artificial diet of varying nutrient and water content. *Physiol. Entomol.* **13**: 303.
- Timmins, W. A., Reynolds, S. E., 1992. Azadirachtin inhibits secretion of trypsin in midgut of *Manduca sexta* caterpillars: reduced growth due to impaired protein digestion. *Entomol. Exp. Appl.* **63**: 47.
- Triguéros, M., Wang, M., Père, D., Paquereau, L., Chavant, L., Fournier, D., 2000. Modulation of a lectin insecticidal activity by carbohydrates. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **45**: 175-179.
- Van Damme, E. J. M.; Briké, F.; Winter, H. C.; Van Leuven, F.; Goldstein, I. J.; Peumans, W. J., 1996. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. *Eur. J. Biochem.* **236**: 419-427.
- Van Damme, E. J. M.; Lannoo, N., Fouquaert, E.; Peumans, W., 2004. The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. *Glycoconjugate J.* **20**: 449-460.
- Van Damme, E. J. M.; Peumans, W. J.; Barre, A.; Rougé, P., 1998. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Plant Science* **17**: 575-692.

- Vasconcelos, I. M.; Oliveira, J. T., 2004. Antinutricional properties of plant lectins. *Toxicon* **44**: 385-403.
- Wagner, J. G., Roth, R. A., 2000. Neutrophil migrations mechanisms, with and emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol. Rev.* **52**(3): 349-374.
- Wang, P.; Granados, R. R., 2001. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): Identification of potential PM target sites for insect control. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **47**: 110-118.
- Wasserman, S. I., 1988. Platelet activating factor as a mediator of brochial asthma. *Hosp. Pract.* **23**: 49-56.
- Wheeler, D. A., Isman, M. B., 2001. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. *Entomol. Exp. Appl.* **98**: 9-16.
- Xie, Y., Isman, M. B., 1992. Antifeeding and growth inhibitory effects of tall oil and derivates against the variegated cutworm, *Peridroma saucia* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Can. Ent.* **124**: 861-869.
- Zhang W, Peumans WJ, Barre A, Houll'es-Astoul C, Rovira P, Roug'e P, Proost P, Truffa-Bachi P, Jalali AAH, Van Damme EJM, 2000. Isolation and characterization of a jacalin-related mannosebinding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Planta* **210**: 970-8.
- Zhu, K.; Huesing, J. E.; Shade, R. E.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M., Murdok, L. L., 1996. An insecticidal N-acetilglucosamine-specific lectin gene from *Griffonia simplicifolia* (Leguminosae). *Plant Physiol.* **110**: 195-202.
- Zhu-Salzman, K.; Shade, R. E.; Koiwa, H.; Salzman, R. A.; Narasimhan, M.; Bressan, I. A.; Hasegawa, P. M.; Murdock, L. L., 1998. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(25): 15123-15128.
- Zouki, C., Baron, C., Fournier, A., Filep, J.G., 1999. Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET_A receptors and platelet-activating factor. *Br. J. Pharmacol.* **127**: 969-979.