



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ – UECE  
INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PPGCF**

**RENATA MORAIS FERREIRA AMORIM**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA  
LECTINA DE SEMENTES DE *Lonchocarpus araripensis***

**FORTALEZA  
2018**

**RENATA MORAIS FERREIRA AMORIM**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA  
LECTINA DE SEMENTES DE *Lonchocarpus araripensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota

**FORTALEZA  
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Amorim, Renata Moraes Ferreira Amorim.

Mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da lectina de sementes de *Lonchocarpus araripensis* [recurso eletrônico] / Renata Moraes Ferreira Amorim Amorim. - 2018.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 78 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2018.

Área de concentração: Ciências Fisiológicas.

Orientação: Prof.ª Ph.D. Ana Maria Sampaio Assereuy.

Coorientação: Prof. Ph.D. Mário Rogério Lima Mota.

1. *Lonchocarpus araripensis*. 2. Dalbergieae. 3. Hipernocicepção. 4. L-arginina/NO/GMPC/K+ATP. 5. receptores endocanabinóides. I. Título.

**RENATA MORAIS FERREIRA AMORIM**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA  
LECTINA DE SEMENTES DE *Lonchocarpus araripensis***

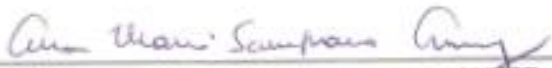
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Ciências Fisiológicas do Instituto Superior de  
Ciências Biomédicas da Universidade Estadual  
do Ceará como requisito para obtenção do título  
de Doutor em Ciências Fisiológicas.


Aprovada em: 26/04/2018

Nota: 10,0

Conceito obtido: Satisfatório

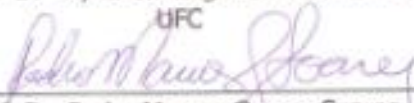
**BANCA EXAMINADORA**

  
Profª Drª Ana Maria Sampaio Assereuy / UECE  
orientadora

  
Profª Drª Delane Viana Gondim  
UFC

  
Profª Drª Cláudia Ferreira Santos  
UECE

  
Profª Drª Kyria Santiago do Nascimento  
UFC

  
Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares  
UFC

A Deus, a quem dedico as primícias de tudo o que tenho e sou.

Aos meus pais Deusimar e Rejane, que me ensinaram valores que não são aprendidos na escola, com eles aprendi que o diploma não me faz melhor do que ninguém, aprendi a respeitar, saber esperar, honrar compromissos e horários, valorizar o alimento e o trabalho. E o mais importante, aprendo muito sobre o amor todos os dias!

Aos meus irmãos, Simone e Davi, por compartilharem todo esse aprendizado comigo e terem me dado de presente meus afilhados lindos Mariana e Mateus!

Ao meu amor, André, pelo amor, carinho, cuidado, companheirismo, além do apoio e torcida em todos os momentos nesta jornada.

Em especial, à minha pequena Sabrina, por ter me ensinado que gestar é um milagre e que amamentar é divino. Com você filha entendi a verdadeira força que tenho, me tornei um ser humano melhor, mais generoso, amável. Obrigada pela alegria de amar e ser amada incondicionalmente.

***Dedico este trabalho***

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy, por ter me recebido em seu laboratório e ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada pela incansável dedicação ao programa e ao laboratório. Obrigada por se importar com a formação científica e não apenas com as exigências das agências de fomento. A senhora é a grande responsável pelo meu crescimento como pesquisadora.

Ao meu co-orientador Dr. Mário Rogério Lima Mota pela ajuda fundamental na realização deste trabalho. Obrigada pela disponibilidade, pelo cuidado e capricho na orientação e pelas belas discussões.

Aos professores colaboradores Dr. Benildo Sousa Cavada, Dra. Kyria Santiago do Nascimento e toda a equipe do BIOMOLAB- UFC por contribuírem com a purificação da lectina e com a qRT-PCR.

À professora Dra. Delane Viana Gondim, à Me. Anamaria Falcão Pereira e ao Me Helson Freitas da Silveira por contribuírem com a coleta dos tecidos do gânglio da raiz dorsal.

Ao Dr. Paulo Goberlanio de Barros Silva por contribuir com a imuno-histoquímica.

Ao Centro Universitário Christus pelo fornecimento dos animais para realização do experimento para realização da imunohistoquímica.

À Dra. Alana de Freitas Pires que sempre me ensinou com muita sabedoria e paciência, sendo, também, responsável por meu aprendizado no laboratório.

Aos professores Dra. Maria Gonçalves Pereira, Dra. Edna Maria Camelo Chaves, Dr. Gislei Frota Aragão e Dr. Rondinelle Ribeiro Castro pela colaboração junto ao LAFFIN.

Aos amigos do LAFFIN: Gabriela, Lívia de Paulo, Timna, Lívia Almeida, Lucas, Juliana, Pedro, Polly, Dayanne, Bia, Débora, Cléo, Diego, Róbio, Amaurílio, Raquel, Glerison pelo companheirismo e agradável companhia.

Às alunas de iniciação científica, Larissa e Stephanie, muito obrigada pela disposição e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Cleidson, pela dedicação no cuidado aos nossos animais, bem como a solicitude e presteza em nos ajudar sempre que necessário.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade de fazer um doutorado em Fisiologia aqui no Ceará. Agradeço, também, a Ecila e Lindalva pela presteza e dedicação.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

“Quanto mais eu estudo a natureza mais fico  
impressionado com a obra do Criador.  
Nas menores de suas criaturas Deus  
colocou propriedades extraordinárias”.

Louis Pasteur

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	17
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
3.1 Dor e nocicepção .....	17
3.2 Dor inflamatória .....	19
3.3 Hipernocicepção induzida por carragenana .....	21
3.4 Sistema canabinoide e modulação da dor.....	22
3.5 Óxido nítrico e a modulação da dor .....	23
3.6 Lectinas.....	25
3.7 Lectinas de leguminosas e atividades na dor inflamatória .....	27
3.8 Lectina de <i>Lonchocarpus araripensis</i> .....	28
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 Animais.....	30
4.2 Drogas e reagentes.....	30
4.3 Isolamento e purificação da lectina.....	31
4.4 Indução da dor inflamatória: alodinia mecânica.....	31
4.5 Imuno-histoquímica .....	33
4.6 Análise da expressão relativa do gene nNOS.....	34
a) Extração de RNA total.....	34
b) Síntese do DNA complementar (cDNA) .....	35
c) Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e análise da expressão relativa.....	35
4.7 Análise estatística.....	36
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
5.1 A LAL inibe a hipernocicepção induzida por carragenana via domínio lectínico.....	37
5.2 O efeito antinociceptivo da LAL é inibido por L-NAME.....	37



5.3 O efeito antinociceptivo da LAL não é inibido por aminoguanidina .....	40
5.4 O efeito antinociceptivo da LAL é inibido por 7-nitroindazol.....	40
5.5 O efeito antinociceptivo da LAL é inibido por ODQ.....	43
5.6 O efeito antinociceptivo da LAL é inibido por glibenclamida.....	43
5.7 O efeito antinociceptivo da LAL é inibido por nifedipina .....	46
5.8 O efeito antinociceptivo da LAL é inibido por ácido niflúmico.....	46
5.9 O efeito antinociceptivo da LAL é inibido por AM251 e AM630.....	49
5.10 A LAL aumentou a imunexpressão para nNOS nos gânglios da raiz dorsal de camundongos.....	50
5.11 A LAL aumentou a expressão do gene para nNOS no tecido da pata de camundongos .....	51
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO D.....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Lonchocarpus araripensis</i> BENTH	30
Figura 2	Protocolo do bloqueio farmacológico	33
Figura 3	A LAL inibe a hipernociceção induzida por carragenana via domínio lectínico.	38
Figura 4	O efeito antinociceptivo da LAL é inibido por L-NAME	39
Figura 5	O efeito antinociceptivo da LAL não é inibido por aminoguanidina	41
Figura 6	O efeito antinociceptivo da LAL é inibido por 7-Nitroindazol	42
Figura 7	O efeito antinociceptivo da LAL é inibido por ODQ	44
Figura 8	O efeito antinociceptivo da LAL é inibido por glibenclamida	45
Figura 9	O efeito antinociceptivo da LAL é inibido por nifedipina	47
Figura 10	O efeito anpernociceptivo da LAL é inibido por ácido niflúmico	49
Figura 11	O efeito antinociceptivo da LAL é inibido por AM251 e AM630	49
Figura 12	Imunoexpressão para nNOS em gânglios da raiz dorsal de camundongos no modelo de hipernociceção induzida por carragenana	50
Figura 13	Expressão do o gene para nNOS no tecido da pata de camundongos avaliados no modelo de hipernociceção induzida por carragenana	52

## LISTA DE TABELAS

		<b>Página</b>
Tabela 1	Lectinas da tribo Dalbergieae e atividades na inflamação	28
Tabela 2	Detalhamento das drogas utilizadas no estudo	32
Tabela 3	Sequência de Primers para qRT-PCR	36
Tabela 4	Escores de imunoexpressão para nNOS em gânglios da raiz dorsal de camundongos avaliados no ao modelo de hipernocicepção induzida por carragenana	50
Tabela 5	Perfil quantitativo do RNA total	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina (do Inglês: 5-hydroxytryptamine)
AMPC	3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BK	Bradicinina
CB1	Receptor endocanabinóide do tipo 1
CB2	Receptor endocanabinóide do tipo 2
Cg	Carragenana
DAINES	Drogas anti-inflamatórias não esteroidais
DEAE	Dietilaminoetil
E.P.M.	Erro padrão da média
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GTP	Guanosina trifosfato
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LAL	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus araripensis</i>
L-NAME	L-nitroarginina metil éster
MAPKs	Proteínas quinase ativadas por mitógenos
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NF $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NMDA	N- metil- D- aspartato
PKG	Proteína quinase dependente de

SNC

Sistema nervoso central

TNF- $\alpha$

Fator de necrose tumoral

## RESUMO

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA LECTINA DE SEMENTES DE *Lonchocarpus araripensis*. Renata Morais Ferreira Amorim. Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Maria Sampaio Assereuy. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual do Ceará, 2018.**

Trabalhos anteriores demonstraram que a lectina isolada de sementes de *Lonchocarpus araripensis* inibe a nocicepção periférica em camundongos por mecanismos que envolvem mediadores inflamatórios e canais para Na<sup>+</sup>. O presente trabalho investigou os mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva da lectina de sementes de *L. araripensis* (LAL) utilizando o modelo de hipernocicepção induzida por carragenana em camundongos. A lectina foi isolada e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de quitina, seguida de cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel). Camundongos Swiss machos (25-30 g) foram manipulados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo CEUA/UECE (Nº 2127461/2015). A hipernocicepção foi induzida pela administração de carragenana (300 µg/pata) por via subcutânea intraplantar e mensurada pela reação do animal resultante da aplicação de estímulo mecânico (filamentos rígidos - von Frey eletrônico) no centro da pata. Foram realizadas 3 aplicações consecutivas do estímulo, em intervalos de 3 min e a avaliação feita imediatamente antes (tempo zero), 1 h e 3 h após a injeção de carragenana. A LAL (0,01 - 10 mg/Kg) foi administrada por via endovenosa (e.v.) 30 min antes da indução da hipernocicepção. A participação do domínio lectínico foi avaliada pela incubação da lectina, por 1 h a 37 °C, associada ao açúcar ligante N-acetil-glicosamina (0,1 M) antes da administração e.v. nos animais. Os camundongos foram tratados com inibidores das enzimas: óxido nítrico sintase (L-nitro arginina metil éster - L-NAME), óxido nítrico sintase induzida (aminoguanidina), óxido nítrico sintase neuronal (7-nitroindazol), guanilato ciclase (ODQ); de canais para K<sup>+</sup> dependentes de ATP (glibenclamida), canais para Ca<sup>2+</sup> do tipo L (nifedipina), canais de Cl<sup>-</sup> dependentes de Ca<sup>2+</sup> (ácido niflúmico); e dos receptores canabinóides CB1 (AM251) e CB2 (AM630) 30 min antes da LAL (10 mg/kg; e.v.). A expressão de nNOS foi quantificada por imuno-histoquímica no gânglio da raiz dorsal e a sua expressão gênica relativa por qRT-PCR no tecido da pata. Os resultados foram apresentados como média ± E.P.M (n= 8 animais/grupo) e a análise estatística realizada pelos testes ANOVA e Bonferroni. Os escores histológicos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunns. Valores de p<0,05 foram considerados significativos. A hipernocicepção induzida por carragenana (1 h: 3,5 ± 0,32 g) foi reduzida pelo tratamento com a LAL nas doses de 0,1 (1 h: 49%; 3 h: 48%); 1 (1 h: 90%; 3 h: 68%) e 10 mg/kg (1 h: 100%; 3 h: 94%). O efeito inibitório da LAL foi revertido pela incubação da lectina com N-acetil-glicosamina (1 h: 5,5 ± 0,5 g; 3 h: 5,75 ± 0,75 g), pela administração prévia de L-NAME (1 h: 6,87 ± 0,58 g; 3 h: 5,62 ± 0,41 g), 7-Nitroindazol (1 h: 5,01±0,79 g; 3 h: 6,05±0,66 g), ODQ (1 h: 4,62 ± 0,37 g; 3 h: 5,32 ± 0,31 g), glibenclamida (1 h: 4,50 ± 0,56 g; 3 h: 5,75 ± 0,35 g), nifedipina (1 h: 5,67 ± 0,56 g; 3 h: 5,37 ± 0,65 g), ácido niflúmico (1 h: 6,3 ± 0,35 g; 3 h: 6,1 ± 0,37 g), AM251 (1 h: 4,75 ± 0,41 g; 3 h: 4,5 ± 0,53 g) e AM630 (1 h: 5,67 ± 0,56 g; 3 h: 5 ± 0,68 g), mas não por aminoguanidina. Além disso, a lectina aumentou a imunoexpressão e a expressão gênica de nNOS. A lectina de *Lonchocarpus araripensis* inibe a nocicepção em camundongos via ativação das vias de sinalização L-arginina/NO/GMPc/K+ATP e sistema endocanabinóide.

**Palavras-chave:** *Lonchocarpus araripensis*, Dalbergieae, hipernocicepção, L-arginina/NO/GMPc/K+ATP, receptores endocanabinóides.

## ABSTRACT

**THE UNDERLYING MECHANISMS OF THE ANTINOCICEPTIVE LECTIN ISOLATED FROM *Lonchocarpus araripensis* SEEDS. Renata Morais Ferreira Amorim. Supervisor: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Sampaio Assereuy. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual do Ceará, 2018.**

Previous studies had shown that the seed lectin isolated from *Lonchocarpus araripensis* inhibits peripheral nociception in mice by mechanisms involving inflammatory mediators and Na<sup>+</sup> channels. This study investigated the underlying mechanism of the antinociceptive activity of a seed lectin isolated from *Lonchocarpus araripensis* (LAL) in the model of hypernociception induced by carrageenan in mice. The lectin was isolated and purified by affinity chromatography (chitin column), followed by ion exchange chromatography (DEAE-Sephacel). Male Swiss mice (25-30 g) were used in accordance with the principles recommended by the Ethics Committee CEUA/UECE (N<sup>o</sup> 2127461/2015). The hypernociception was induced by subcutaneous intraplantar injection of carrageenan (300 µg/paw) and measured by the reaction of the animal resultant from the application of mechanical stimulus (rigid filaments - electronic von Frey) in the center of the paw. Three consecutive stimulus were applied at 3 min intervals and the evaluation performed immediately before (time zero), 1 h and 3 h after carrageenan. LAL (0.01 - 10 mg/kg) was administered intravenously (i.v.) 30 min before hypernociception induction. Participation of the lectin domain was assessed by lectin incubation for 1 h at 37 °C, associated with its binding sugar N-acetyl-glycosamine (0.1 M) before test. Mice were treated with inhibitors of the enzymes: nitric oxide synthase (L-nitro arginine methyl ester - L-NAME), nitric oxide synthase induced (aminoguanidine), neuronal nitric oxide synthase (7-nitroindazole), guanylate cyclase (ODQ); K<sup>+</sup> channels ATP dependent (glibenclamide), Ca<sup>2+</sup> channels type L (nifedipine), Cl<sup>-</sup> channels Ca<sup>2+</sup> dependent (niflumic acid); and CB1 (AM251) and CB2 (AM630) cannabinoid receptors 30 min before LAL (10 mg/kg; i.v.). The nNOS expression was quantified by immunohistochemistry in the dorsal root ganglion and its relative gene expression by qRT-PCR in paw tissue. Results were expressed as Mean ± SEM (n=8 animals/group) and analyzed by ANOVA, followed by Bonferroni's test. Histological scores were assessed by Kruskal-Wallis followed by Dunns test, considering p<0.05. Carrageenan-induced hypernociception (1 h: 3.5 ± 0.32 g) was inhibited by LAL at 0.1 (1 h: 49%; 3 h: 48%); 1 (1 h: 90%; 3 h: 68%) and 10 mg/kg (1 h: 100%; 3 h: 94%). The inhibitory effect of LAL was reversed by the association with its binding sugar N-acetylglucosamine (1 h: 5.5 ± 0.5 g, 3 h: 5.75 ± 0.75 g), by prior administration of L-NAME (1 h: 6.87 ± 0.58 g, 3 h: 5.62 ± 0.41 g), 7-Nitroindazole (1 h: 5.01 (1 h: 4.62 ± 0.37 g, 3 h: 5.32 ± 0.31 g), glibenclamide (1 h: 4.50 ± 0.56 g, 3 h: 5.75 ± 0.35 g), nifedipine (1 h: 5.67 ± 0.56 g, 3 h: 5.37 ± 0.65 g), (1 h: 6.3 ± 0.35 g, 3 h: 6.1 ± 0.37 g), AM 251 (1 h: 4.75 ± 0.41 g, 3 h: 4.5 ± 0.53 g) or AM630 (1 h: 5.67 ± 0.56 g, 3 h: 5 ± 0.68 g), but not by aminoguanidine. In addition, lectin increased the immunoeexpression and gene expression of nNOS. The lectin of *Lonchocarpus araripensis* inhibits nociception in mice via activation of L-arginine/NO/cGMP/K<sup>+</sup>ATP signaling pathways and the endocannabinoid system.

**Key-words:** *Lonchocarpus araripensis*, Dalbergieae, hipernociception, L-arginine/NO/cGMP/K<sup>+</sup>ATP, endocannabinoid receptors.