

**PARASITISMO GASTRINTESTINAL
DE PEQUENOS RUMINANTES
X AÇÃO NEMATICIDA
DE UMA PROTEÍNA DE
*Moringa oleifera***

MÁRIO LUAN SILVA DE MEDEIROS
MICHELE DALVINA CORREIA DA SILVA



MÁRIO LUAN SILVA DE MEDEIROS
MICHELE DALVINA CORREIA DA SILVA

**PARASITISMO GASTRINTESTINAL
DE PEQUENOS RUMINANTES
X AÇÃO NEMATICIDA
DE UMA PROTEÍNA DE
*Moringa oleifera***



MOSSORÓ | 2019

**PARASITISMO GASTRINTESTINAL
DE PEQUENOS RUMINANTES
X AÇÃO NEMATICIDA
DE UMA PROTEÍNA DE
*Moringa oleifera***

MÁRIO LUAN SILVA DE MEDEIROS
MICHELE DALVINA CORREIA DA SILVA



Os textos assinados, no que diz respeito à linguagem quanto ao conteúdo, não refletem necessariamente a opinião da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.

As informações contidas no livro são de inteira responsabilidade dos seus autores.



Reitor
Pedro Fernandes Ribeiro Neto

Vice-Reitor
Fátima Raquel Rosado Morais

Diretora de Sistema Integrado de Bibliotecas
Jocelânia Marinho Maia de Oliveira

Chefe da Editora Universitária – EDUERN
Anairam de Medeiros e Silva



Conselho Editorial das Edições UERN

Diego Nathan do Nascimento Souza
Ellany Gurgel Cosme do Nascimento
Emanoel Márcio Nunes
Isabela Pinheiro Cavalcante Lima
Ivanaldo Oliveira dos Santos Filho
Jean Henrique Costa
José Cezinaldo Rocha Bessa
José Elesbão de Almeida
Wellington Vieira Mendes

Projeto gráfico:
André Duarte da Silva

Catálogo da Publicação na Fonte.

Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.

Parasitismo gastrointestinal de pequenos ruminantes x ação nematicida de uma proteína de moringa oleifera/

Mário Luan Silva de Medeiros, Michele Dalvina Correia da Silva (Autores) – Mossoró – RN: EDUERN, 2019.

97p.

ISBN: 978-85-7621-261-4 (E-book)

1. Ciências biológicas. 2. Bioquímica. 3. Proteínas. 4. Parasitologia. I. Medeiros, Mario Luan Silva de. II. Silva, Michelle Dalvina Correia da. III. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. IV. Título.

UERN/BC

CDD 591.785 7

Bibliotecário: Petronio Pereira Diniz Junior CRB 15 / 782

Endereço:

Campus Universitário Central, Rua Professor Antônio Campos, s/n, BR 110, km 48, Bairro Costa e Silva, CEP: 59600-000, Mossoró/RN

Contato:

Fone: (84) 3312-0518

E-mail: edicoes.uern@uern.br

SOBRE OS AUTORES



**Prof. Msc. Mário Luan
Silva de Medeiros**

Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Biólogo Licenciado pelo Centro Universitário Claretiano, iniciou a sua trajetória na pesquisa científica com a investigação de aplicações biotecnológicas de bioprodutos de origem natural; Especialista em Biotecnologia (UCDB) e Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular (UERN), foi Professor de Bioquímica do Depto. de Ciências Biomédicas da UERN. Publicou trabalhos de circulação nacional e internacional e já recebeu prêmios de mérito acadêmico. Atualmente, é aluno do Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular (UERN), fazendo parte de grupos de pesquisa que visam à bioprospeção de lectinas com atividades biológicas.



**Profa. Dra. Michele
Dalvina Correia da Silva**

Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Mestre em Bioquímica pelo atual Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da UFPE; Doutora em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE. É Professora Associado I (DE) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e

membro permanente do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (PMBqBM/UERN). Coordena o grupo de pesquisas “Lectinas com Potencial Biotecnológico” na UFERSA, orientando alunos de graduação e pós-graduação no desenvolvimento de pesquisas que visam à purificação, caracterização físico-química estrutural e aplicações biotecnológicas de proteínas vegetais do tipo lectinas na área médica (humana e animal), agrícola e de pesquisa biológica.

AGRADECIMENTOS



Os autores agradecem a todos os profissionais colaboradores que tanto contribuíram de diferentes formas para o desenvolvimento de pesquisas, as quais permitiram, entre outras conquistas, a geração desta obra:

À Professora Dra. Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), e também à sua equipe de alunos de iniciação científica e de pós-graduação que compõem o Laboratório de Imunologia e Parasitologia Molecular (LIPAM) da UFERSA.

Aos colaboradores, alunos de iniciação científica e de pós-graduação que compõem o Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LABCEMOL) da UFERSA.

Aos Professores da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva e Dr. Thiago Henrique Napoleão.

Os autores são gratos ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM), que aprovou o desenvolvimento de um projeto de dissertação a partir do qual esta obra foi construída.

Um agradecimento especial à Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), pelo reconhecimento do mérito desta obra e por tornar possível a sua publicação.

Por fim, porém não menos importante, os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq) e à Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), por acreditarem e investirem, das formas possíveis, na formação de bons profissionais capazes de contribuir para o desenvolvimento da ciência e tecnologia no Brasil.

Mário L. S. de Medeiros

Michele D. C. da Silva



A espécie *Moringa oleifera* Lam., conhecida como árvore raba-no e quiabo de quina, é um arbusto, pertence à família Moringaceae, é caducifólia e cultivada em diversos lugares, tais como Índia, Afeganistão, Bangladesh, México, Paraguai e Brasil (FERREIRA et al., 2009). Desta espécie, diversas aplicações utilizando seus tecidos já exerceram contribuições para o conhecimento científico. O extrato aquoso das folhas já apresentou atividade antioxidante e hipocolesterolêmica (CHUMARK et al., 2008); pesquisas com preparações proteicas obtidas de sementes já apresentaram propriedades contra microrganismos (CHUANG et al., 2007), ação antitumoral, anti-inflamatória, diurética, larvicida, dentre outras (BHARALI et al., 1999; GUEVARA et al., 1999).

Entre as biomoléculas isoladas de plantas e utilizadas para aplicações biológicas diversas, destacam-se as lectinas, proteínas de origem não imune com atividade aglutinante celular promovida através de sítios não catalíticos capazes de se ligarem reversivelmente a glico-conjugados de superfícies celulares, a carboidratos, bem como a glicoproteínas (SANTOS et al., 2005; KATRE et al., 2008). De sementes da espécie *M. oleifera*, já foram isoladas diferentes lectinas: WSMoL, solúvel em água, de caráter ácido, com aproximadamente 60 kDa (SANTOS et al., 2005; MOURA et al., 2016); Mol, que possui atividade hemaglutinante na faixa de pH de 1-12 com peso molecular de 7.1 kDa (KATRE et al., 2008); cMol, uma lectina de caráter básico, com 26.5 kDa e com atividade hemaglutinante na faixa de pH de 4-9 (ARAÚJO et al., 2013; SANTOS et al., 2009); MOSL, lectina de sementes da *Moringa oleifera* com aproximadamente 17.1 kDa e específica aos car-

boidratos metil- α -D-manopiranosideo, metil- β -D-galactopiranosideo, lactose e glicose (ASADUZZAMAN et al., 2018).

As lectinas apresentam diversas aplicações biotecnológicas já elucidadas, como atividade anticâncer (MONTE et al., 2013), anti-inflamatória (BEZERRA, 2012), leishmanicida (AFONSO-CARDOSO et al., 2011), antimicrobiana (RAMOS et al., 2014), antiparasitária (RÍOS-DE ÁLVAREZ et al., 2012a) e inseticida (OLIVEIRA et al., 2011).

Tendo em vista inúmeras aplicações biológicas das lectinas, destaca-se, neste estudo, a prospecção de atividades biotecnológicas da WSMoL aplicada ao controle de nematoides patogênicos para animais. O objetivo central do trabalho foi analisar a lectina solúvel em água purificada de sementes da espécie *M. oleifera*, denominada de WSMoL, através de ensaios *in vitro*, quanto à atividade antiparasitária sobre ovos e larvas de parasitos gastrintestinais, recuperados a partir de fezes de caprinos do Semiárido Nordeste, naturalmente infectados.

A importância em se desenvolver pesquisa nessa temática se justifica devido à problemática real envolvendo o controle de infecções de animais por nematoides gastrintestinais, os quais desenvolvem continuamente resistência aos principais anti-helmínticos comerciais, resultando em prejuízos na produção animal.

Pesquisas voltadas para a prospecção de produtos de origem natural são de grande interesse devido à crescente necessidade de se desenvolver novos medicamentos, com maior eficácia e com menos efeitos colaterais, comparados aos fármacos atualmente disponíveis. Apesar da importância do potencial de moléculas bioativas isoladas de vegetais, o uso de modelos experimentais *in vitro* se torna extremamen-

te necessário para elucidar mecanismos envolvidos na atividade biológica exercida, sendo vital para a descoberta de novas moléculas com atividades promissoras contra doenças humanas e de animais (MEDEIROS, 2013).

SUMÁRIO

SOBRE OS AUTORES	05
AGRADECIMENTOS	07
APRESENTAÇÃO	09
I LECTINAS: MOLÉCULAS BIOATIVAS	13
II <i>Moringa oleifera</i>: CONSIDERAÇÕES GERAIS E POTENCIAL TERAPÊUTICO	26
III NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES	30
IV INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATOCIDA DA LECTINA SOLÚVEL EM ÁGUA (WSMoL), ISOLADA DE SEMENTES DE <i>Moringa oleifera</i>: MÉTODOS	43
V DISCUTINDO OS RESULTADOS DO EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DA WSMoL	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS	78

CAPÍTULO I



LECTINAS: MOLÉCULAS BIOATIVAS

Inicialmente descritas em meados de 1860 como sendo substâncias tóxicas, as lectinas eram chamadas de aglutininas, hemaglutininas, fitoaglutininas ou fitohemaglutininas; posteriormente, o termo hemaglutinina se tornou inapropriado devido ao fato de as lectinas apresentarem efeito aglutinante sobre outros tipos celulares (como microrganismos) e não somente sobre células sanguíneas (ANDRADE, 2003; DIAS, 2006; PAIM, 2006; QUEIROZ, 2008). O termo lectina foi empregado em 1954, por Boyd e Shapleigh, sendo proposto para categorizar algumas aglutininas pela habilidade de diferenciar células sanguíneas do sistema ABO, fato esse que foi elucidado somente após o ano de 1935 (BOYD & SHAPLEIGH, 1954; ANDRADE, 2003; DIAS, 2006; BITENCOURT, 2007; MOURA, 2007; QUEIROZ, 2008). Lectina é um termo que vem do latim *legere*, que tem como significado escolher e/ou selecionar, referindo-se, a princípio, a proteínas encontradas em sementes e em outras partes de vegetais superiores (ANDRADE, 2003; DIAS, 2006; MOURA, 2007; QUEIROZ, 2008).

Posteriormente, em estudos relacionados ao isolamento e purificação dessas proteínas, desvendou-se sua presença, além do reino vegetal (PEREIRA, 2005; PAIM, 2006; BITENCOURT, 2007; MOURA, 2007; QUEIROZ, 2008; MARTINS, 2009), em animais vertebrados (QUEIROZ, 2008; MARTINS, 2009), em animais invertebrados (MOURA, 2007; QUEIROZ, 2008; MARTINS, 2009) e em bactérias, vírus e fungos (PEREIRA, 2005; BITENCOURT, 2007; MARTINS, 2009; HEIM et al., 2015).

Atualmente, o termo lectina é utilizado para designar todas as

proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, com capacidade de se ligar de forma específica e reversível a carboidratos (monossacarídeos ou oligossacarídeos) livres ou ligados a superfícies celulares, e/ou precipitar glicoconjugados; essa ligação é explicada pela presença de pelo menos um domínio não catalítico que reconhece carboidratos, também designado de domínio reconhecedor de carboidratos (DRC), sendo esses domínios conservados no grupo de cada tipo de lectina (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Geralmente, as interações entre lectinas e resíduos de carboidratos são mediadas por pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals (DIAS, 2006; MOURA, 2007; QUEIROZ, 2008). A formação do complexo estável lectina-carboidrato envolve o deslocamento de moléculas de água associadas aos grupos polares do domínio ligante da proteína e as que estão no entorno do carboidrato. Como resultado, há a formação de novas redes de pontes de hidrogênio, juntamente com interações de Van der Waals, que estabilizam o complexo (ZANETTI, 2007). Além da especificidade para carboidratos, muitas lectinas necessitam da presença de íons metálicos divalentes, como Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} . Assim, a presença desses íons favorece e proporciona a atividade específica da lectina. Acredita-se que existam sítios específicos para esses íons na proteína e, quando em contato, os íons acarretam uma modificação estrutural que proporciona a acessibilidade dos sítios de ligação a carboidratos. No entanto, algumas lectinas não necessitam de íons para exercer as suas atividades biológicas; essas possuem estrutura conformacional apropriada para ligação ao carboidrato (ZANETTI, 2007).

As lectinas atuam em diversos processos biológicos, característica comumente mediada pela alta especificidade por carboidratos. Entre suas funções biológicas, pode-se destacar o reconhecimento de

células-alvo, a adesão celular, a interação entre células, a interação entre célula-matriz, a fertilização e a aglutinação de células (CAVADA et al., 2001; HAGE, 2002).

Através de diferentes análises, tem sido demonstrada a grande variedade de lectinas quanto à especificidade a carboidratos, à estrutura molecular (tamanho e organização molecular) e à atividade biológica, constituindo, dessa forma, um grande grupo heterogêneo de proteínas altamente diferenciadas (ANDRADE, 2003; DIAS, 2006; QUEIROZ, 2008).

Lectinas vegetais foram pioneiramente isoladas de sementes da espécie *Ricinus communis* L., por Hermann Stillmark, em 1888, quando este estudava os possíveis efeitos toxicológicos do vegetal (DIAS, 2006; QUEIROZ, 2008; MARTINS, 2009). Stillmark demonstrou que uma molécula ativa que causava aglutinação de eritrócitos era uma proteína, nomeada por ele de ricina (QUEIROZ, 2009). Em mamíferos, Stochert e colaboradores isolaram uma lectina do fígado de coelho, sendo esse o primeiro relato de lectina isolada de mamífero (STOCKERT et al., 1974). Com relação às lectinas de animais vertebrados, a primeira lectina foi detectada no veneno de uma cascavel da espécie *Crotalus durissus* L. por S. Weir Mitchel, em 1860 (MITCHELL, 1860).

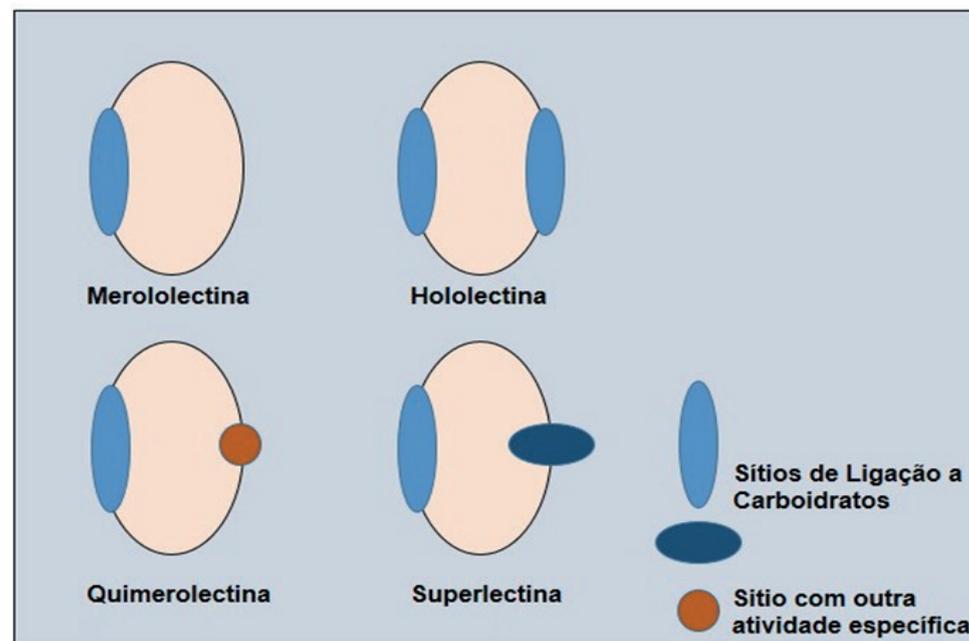
De forma ampla, as lectinas podem ser classificadas quanto às suas características estruturais, quanto à especificidade a carboidratos e de acordo com a distribuição; cada grupo de lectinas apresenta diferenças consideráveis nas suas propriedades biológicas e físico-químicas (DIAS, 2006).

Classificação

As lectinas vegetais são classificadas pelo uso de três sistemas: um baseado na semelhança estrutural; outro, na especificidade a carboidratos e o último pela ocorrência, estrutura e especificidade (ZANETTI, 2007).

Estruturalmente, as lectinas vegetais são classificadas em quatro grandes grupos: as merolectinas; as hololectinas; as quimerolectinas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995) e as superlectinas (VAN DAMME et al., 1998; BITENCOURT, 2009) (Figura 1):

Figura 1: Ilustração esquemática das quatro classes de lectinas, quanto à sua estrutura.



Fonte: Dados do Autor.

Na primeira classe, a das merolectinas, são agrupadas as lectinas que possuem baixo peso molecular e um único domínio de ligação a carboidratos, sendo assim incapazes de aglutinar células e de precipitar glicoconjugados devido à característica monovalente (MOURA, 2007; QUEIROZ, 2008; BITENCOURT, 2009). Dessa classe, podemos citar como exemplo as lectinas de orquídeas, possuindo especificidade para manose, e a lectina do tipo heveína, encontrada no látex de seringueira (BATISTA, 2007; BITENCOURT, 2009).

A classe das hololectinas é constituída pelas lectinas que apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, idênticos ou muito similares, que se ligam ao mesmo tipo de carboidrato ou de estruturas homólogas, sendo assim capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados (BATISTA, 2007; QUEIROZ, 2008; BITENCOURT, 2009). A maioria das lectinas extraídas de vegetais e estudadas está categorizada nessa classe, como por exemplo, a Con A (lectina isolada de *Canavalia ensiformis* (L.) DC., denominada concanavalina A, ou Con A) (MOURA, 2007; ZANETTI, 2007; BITENCOURT, 2009).

As lectinas que apresentam pelo menos dois tipos de domínios funcionais diferentes, com atividades biológicas diferentes, são classificadas como sendo quimerolectinas; possuem um ou mais domínios com ação de ligação a carboidratos ou a glicoconjugados, e um outro domínio com funcionalidade enzimática ou alguma outra atividade biológica que é independente do domínio de ligação a carboidrato (MOURA, 2007; BITENCOURT, 2009). Exemplos de quimerolectinas são a ricina, isolada das sementes de *Ricinus communis* L., e a lectina isolada de *Viscum album* L. (ZANETTI, 2007).

Em 1998, Van Damme e colaboradores definiram um quarto grupo, as superlectinas. As lectinas pertencentes a esse grupo devem

conter pelo menos dois domínios de ligação estruturalmente diferentes e que reconhecem carboidratos diferentes (VAN DAMME et al., 1998; MOURA, 2007; QUEIROZ, 2008). Como exemplo, pode-se citar a lectina da *Tulipa gesneriana* L. 1753, a TGL (ODA et al., 1987).

Em relação à especificidade aos carboidratos, as lectinas podem ser classificadas em diferentes classes: lectinas ligantes de manose; manose/maltose; manose/glicose; galactose/N-acetilgalactosamina; N-acetilglicosamina/(N-acetilglicosamina)_n; fucose e ácido siálico (BATISTA, 2007).

Acredita-se que as lectinas de origem vegetal não possuem preferencialmente afinidade por monossacarídeos. A associação de lectinas com oligossacarídeos é cerca de 1000 vezes maior que com monossacarídeos, em relação ao grau de afinidade (ZANETTI, 2007).

Ainda em 1998, Van Damme e colaboradores classificaram as lectinas pertencentes às angiospermas. Essa classificação se deu utilizando três diferentes parâmetros: a ocorrência; a estrutura molecular e a especificidade aos carboidratos, tendo sido adotada por muitos pesquisadores:

- Lectinas de leguminosas: frequentemente, apresentam de duas a quatro subunidades de 25-30 kDa, sendo que cada subunidade contém um sítio de ligação para carboidrato (REGO et al., 2002; ZANETTI, 2007).
- Lectinas ligantes de quitina: apresentam a capacidade de se ligar à quitina, como também apresentam uma sequência de aproximadamente 40 aminoácidos homóloga à lectina heveína, extraída da espécie *Hevea brasiliensis* (Wild.) Muell. Arg 1865. Assim, as lectinas desse grupo apresentam um domínio conhecido como *domí-*

nio heveína (ZANETTI, 2007; BARBOSA, 2013).

- Lectinas inativadoras de ribossomos: em geral, lectinas pertencentes a esse grupo inibem a síntese proteica, ocasionando a morte celular por retirar vários resíduos de adenina de polinucleotídeos. Possuem duas cadeias, uma responsável por reconhecer carboidratos e outra com função catalítica (AGAPOV et al., 1999).
- Lectinas relacionadas à jacalina: estão evolutivamente e estruturalmente correlacionadas às famílias de moráceas ou convolvuláceas. Aquelas relacionadas com lectinas de moráceas apresentam afinidade para N-acetil-D-galactosamina, enquanto aquelas relacionadas com lectinas de convolvuláceas ligam manose/maltose (ZANETTI, 2007).
- Lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose: as lectinas dessa classe apresentam uma similaridade quanto à sequência de aminoácidos e possuem preferência de ligação à manose (BARBOSA, 2013).
- Lectinas de floema de cucurbitáceas: geralmente, apresentam um domínio específico para quitina, como também são glicosiladas (não havendo um domínio do tipo heveína). Apresentam peso molecular em torno de 25 kDa e alta similaridade nas sequências de aminoácidos (BARBOSA, 2013).
- Lectinas de amarantáceas: não são glicosiladas, compartilham de uma alta similaridade estrutural, possuem peso molecular de aproximadamente 30 kDa e apresentam afinidade por N-acetil-D-galactosamina (ZANETTI, 2007; BARBOSA, 2013).

As lectinas de animais foram classificadas observando-se a homologia existente entre as suas estruturas primárias. Assim, diversos grupos e famílias de lectinas já foram caracterizados, sendo atualmente descritas pelo menos dez famílias de lectinas extraídas do reino ani-

mal (DIAS, 2006; QUEIROZ, 2008). Inicialmente, eram conhecidas somente classes de lectinas animais tipo C, tipo S e as galectinas; mais recentemente, têm sido mencionadas outras classes, como as lectinas tipo-I, tipo-L, anexinas, discoidinas, calreticulinas/calnexinas, eglectinas, e as aglutininas, tipo fibrinogênio e pentraxinas (DIAS, 2006; QUEIROZ, 2008).

Distribuição nos Organismos e Funções Fisiológicas

As Lectinas estão presentes em todos os reinos de seres vivos e abrangem principalmente os reinos animal e vegetal (ANDRADE, 2003; TRINDADE, 2005; LEÓN et al., 2011).

Lectinas foram inicialmente isoladas de representantes do reino vegetal, podendo ser encontradas em todos os tecidos das plantas, constituindo, quando presentes, cerca de 6 a 11 % do conteúdo protéico do vegetal (POVINELI & FINARDI FILHO, 2002; PEDROSO, 2006; GOTO, 2007; PIRES, 2007). De forma resumida, geralmente a rota de produção e armazenamento de lectinas de plantas segue a via secretória, tendo início com sua produção nos ribossomos, sendo direcionadas para o retículo endoplasmático e, por fim, seguem para o complexo de Golgi, permanecendo armazenadas em vacúolos chamados de corpos proteicos. Frequentemente, as lectinas passam por processos co-traducionais, como N-glicosilação, e pós-traducionais e clivagem proteolítica (TRINDADE, 2005).

Acredita-se que, em vegetais, as lectinas desempenhem funções de reserva, sirvam como fatores de reconhecimento, participem do estoque de nitrogênio e tenham envolvimento com os mecanismos de ação protetora (BATISTA, 2007). Argumentos moleculares, bio-

químicos, celulares e fisiológicos indicam que as lectinas apresentam realmente uma ação defensiva nas plantas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Essa defesa se dá pelas características tóxicas das lectinas quando ingeridas e absorvidas pelo trato gastrointestinal, provocando sensações de náuseas e vômito; o predador é assim capaz de reconhecer o vegetal posteriormente, evitando uma nova ingestão (PAIM, 2006). No que se refere às funções fisiológicas das lectinas encontradas nos vegetais, essas podem estar relacionadas às etapas de maturação e germinação de sementes, quando presentes, sendo suas funções as mais variadas, tanto na própria fonte encontrada quanto em outros organismos, quando em contato (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; TRINDADE, 2005; PEDROSO, 2006).

Em animais, as lectinas possuem funções relacionadas ao reconhecimento dentro do sistema imune, estando intrinsecamente envolvidas com as funções de defesa contra patógenos, trânsito celular, regulação de resposta imune e ação preventiva de autoimunidade (TRINDADE, 2005).

Em outros organismos e estruturas, como as bactérias, protozoários, fungos e vírus, a presença de lectinas parece estar relacionada ao desenvolvimento de funções para auxiliar ou promover a adesão desses às estruturas celulares hospedeiras nas quais se multiplicam (DIAS, 2006; KOBAYASHI & KAWAGISHI, 2014).

Lectinas de Vegetais: propriedades biológicas

A prospecção de novas biomoléculas biologicamente ativas vem possibilitando o aumento de aplicações biotecnológicas, através do desenvolvimento de novos métodos, protocolos experimentais, técnicas

e tecnologias e da determinação dos mais diversos fenômenos biológicos (LEÓN et al., 2011).

Assim, visando à exploração sustentável de lectinas como biomoléculas com atividades diversas em potencial, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas, revelando um leque de possibilidades de aplicações biológicas para essas proteínas, além de suas múltiplas funções envolvidas em fenômenos biológicos.

Em 1995, Peumans e Van Damme realizaram uma revisão sobre lectinas de plantas e as suas principais propriedades biológicas, sendo destacadas a ação antiviral, antibacteriana, antifúngica, inseticida e a atividade tóxica em animais (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). León e colaboradores (2011) também desenvolveram uma revisão sobre o potencial dessas biomoléculas na área biomédica, destacando atividades promissoras contra infecções virais, na indução de mitose em linfócitos, ação citotóxica e efeitos antinutricionais.

Além dos trabalhos citados anteriormente, há diversos outros estudos se referindo ao grande potencial biotecnológico das lectinas extraídas de plantas nas mais variadas aplicações biológicas (POVINELI & FINARDI FILHO, 2002; DRESCH et al., 2005; PEREIRA, 2005; SOUZA et al., 2005; MOURA, 2007; MARTINS, 2009; LIMPIAS et al., 2010; SILVA et al., 2010; BEZERRA, 2012). Entre as potencialidades biotecnológicas das lectinas vegetais, algumas podem ser destacadas como referências para validar as atividades biológicas dessas biomoléculas:

- **Atividade Antiviral:** investigações indicam a ação antiviral de lectinas de plantas, atuando contra a disseminação de vírus e/ou contra a própria infecção viral. As lectinas com esse potencial atuam, ge-

ralmente, contra vírus de animais e humanos que possuem, em sua composição, glicoproteínas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Tal ação está relacionada com a capacidade da lectina de interagir com receptores específicos dos capsídeos virais, promovendo o desencadear de reações de inativação por formar um complexo lectina-vírus (LEÓN et al., 2011).

- Atividade Antibacteriana: a atividade antibacteriana de lectinas envolve compostos da parede celular ou glicanos extracelulares. Essas biomoléculas interagem fortemente com o microrganismo, promovendo perda da motilidade, resultando em morte celular (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; SINGH et al., 2013).
- Atividade Anti-inflamatória: vem sendo demonstrada a ação de lectinas com efeito modulador nos processos da inflamação, nos processos de migração celular e/ou nos processos de produção de mediadores inflamatórios. Esses efeitos ocorrem devido à inibição lectínica da adesão leucocitária ao endotélio do vaso (BEZERRA, 2012; CORIOLANO et al., 2014; SANTIAGO et al., 2014).
- Atividade Antifúngica: a interação de lectinas com carboidratos da parede celular de fungos, promovendo efeitos desfavoráveis em seus constituintes, pode estar envolvida com o desencadear de mecanismos que promovem desordem na parede celular e efeito antifúngico (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; SINGH et al., 2013).
- Atividade Inseticida: lectinas extraídas de plantas com atividade inseticida possuem ação tóxica, provocando a morte de larvas e de insetos adultos. Acredita-se que o efeito protetor que as lectinas apresentam nos vegetais contra diversos predadores é o que caracteriza o possível potencial inseticida dessas proteínas (FARIAS et al., 2010; SILVA et al., 2010). A ligação de lectinas em receptores

contendo glicoproteínas no trato digestivo dos insetos pode promover uma insuficiência fisiológica, resultando em ação repelente ou até mesmo em morte sistêmica. Assim, ligações específicas de lectinas, tanto em receptores ao longo do sistema digestivo quanto em enzimas digestivas, estão correlacionadas à potencial toxicidade contra insetos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

- Atividade Antitumoral: grupos de lectinas com ação citotóxica geralmente apresentam duas subunidades: uma responsável pelo reconhecimento de glicídios na membrana celular e a outra responsável por penetrar no interior celular, promovendo a ação citotóxica; essa internalização é de suma importância para possíveis efeitos apoptóticos, podendo também desencadear a liberação de compostos que auxiliam em um efeito antitumoral (POVINELI & FINARDI FILHO, 2002; PEREIRA, 2005; SOUZA et al., 2005; MOURA, 2007; MARTINS, 2009; LEÓN et al., 2011; BEZERRA, 2012).
- Aglutinação de Eritrócitos e Outras Células: sendo a primeira propriedade biológica desvendada das lectinas, a aglutinação é o resultado de interações das lectinas com a membrana das diversas células (eritrócitos, bactérias, linfócitos, plaquetas, espermatozóides, entre outras); tal propriedade é reversível e pode sofrer inibição por açúcares (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; DRESCH et al., 2005; SILVA et al., 2010; LEÓN et al., 2011).
- Detecção de Antígenos: atualmente, há grande interesse em investigações para identificação de moléculas antigênicas. Muitas lectinas estão sendo estudadas e aplicadas na detecção de antígenos específicos; é o caso das lectinas extraídas das plantas *Salvia sclarea* Benth., *Vicia villosa* Brot. e *Helix pomatia* L.. Essa utilização é geralmente chamada de lectinohistoquímica (LIMPIAS et al., 2010).
- Atividade Anti-helmíntica: Ríos-de Álvarez e colaboradores

(2012a; 2012b) verificaram, *in vitro*, a atividade das lectinas WGA (*Triticum vulgare* Vill.), Con A (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.) e PHA-E3L (*Phaseolus vulgaris* L.) contra nematoides gastrintestinais (NGI) de pequenos ruminantes, avaliando sua capacidade imunogênica, bem como seus efeitos nocivos no desenvolvimento das larvas e na eclosão de ovos.

Dessa forma, pode-se verificar em muitos estudos o grande leque de prospecção biotecnológica das lectinas vegetais, evidenciando diversas aplicações para diferentes áreas de interesse.

CAPÍTULO II



Moringa oleifera: CONSIDERAÇÕES GERAIS E POTENCIAL TERAPÊUTICO

A espécie vegetal *M. oleifera* L. (Figura 2), descrita inicialmente por Lamarck, em 1785, é uma árvore da família Moringaceae, sendo conhecida popularmente como morango, moringa, árvore de rabano, cedro, reseda, angela, árvore da vida e árvore dos milagres (OLIVEIRA et al., 1999; FERREIRA et al., 2009; MARTÍN et al., 2013). Pertencente ao conjunto das quatorze espécies categorizadas do gênero *Moringa*, a *M. oleifera* é originalmente nativa do Himalaia (OLIVEIRA et al., 1999; ARAÚJO et al., 2013; MARTÍN et al., 2013).

Figura 2: Partes da espécie *Moringa oleifera*: vagem, sementes, flores, folhas e árvore completa.



A – vagem; B – sementes; C – flores; D – folhas; E – árvore completa. Fonte: Dados do Autor, 2019.

As espécies desse gênero são encontradas principalmente na Índia, Paquistão, Filipinas, Tailândia, Malásia, Singapura, Afeganistão e Bangladesh, sendo também cultivadas em todas as regiões tropicais, subtropicais e semiáridas, inclusive na América do Sul e na África (OLIVEIRA et al., 1999; ARAÚJO et al., 2013; MARTÍN et al., 2013; AL-ANIZI et al., 2014). O cultivo se dá basicamente com a finalidade extensiva do uso da planta; como exemplo, pode-se citar a preparação de temperos (na qual são utilizadas as raízes), a formulação de cosméticos (utilizando-se o óleo das sementes) e o uso intenso na cultura medicinal (sendo utilizadas todas as partes da planta) (OLIVEIRA et al., 1999; GALUPPO et al., 2014).

Estudos relacionados ao levantamento de atividades biológicas da espécie *M. oleifera* evidenciaram o seu grande potencial, com promissores efeitos benéficos quando utilizada para fins terapêuticos, sendo a espécie designada por Martín et. al (2013) como *árvore milagrosa*.

Atividades como antitumoral (FERREIRA et al., 2009; GALUPPO et al., 2014; YASSA & TOHAMY, 2014), antioxidante (SANTOS et al., 2005; FERREIRA et al., 2009; GALUPPO et al., 2014; YASSA & TOHAMY, 2014), hipoglicemiante, hipotensora (GALUPPO et al., 2014; YASSA & TOHAMY, 2014), hepatoprotetora (GALUPPO et al., 2014), imunomoduladora (GALUPPO et al., 2014), antimicrobiana (FERREIRA et al., 2009; AL-ANIZI et al., 2014), larvicida, ovicida (*Aedes Aegypti* L.) (COELHO et al., 2009; FERREIRA et al., 2009; SANTOS et al., 2012) e anti-inflamatória (FERREIRA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2013; YASSA & TOHAMY, 2014) já foram citadas a respeito da espécie *M. oleifera*; tais propriedades são fortes aspectos biológicos que justificam a exploração da espécie pela comunidade científica, para a elucidação específica desses efeitos em sistemas biológicos, seja *in vitro* ou *in vivo*.

Já foram isolados da *M. oleifera* compostos do tipo glucosinatos, que são metabólitos secundários, contendo a molécula de enxofre na sua composição, havendo relatos de efeitos desses compostos relacionados à modulação da progressão de cânceres e ao retardamento de doenças degenerativas (GALUPPO et al., 2014).

Outro composto isolado da *M. oleifera*, o 4-(α -L-ramnosiloxibenzil) isotiocianato, apresentou efeito redutor do crescimento em colônias microbianas, sendo classificado como um composto antimicrobiano (AL-ANIZI et al., 2014).

Yassa e Tohamy (2014) mostraram que o extrato das folhas da *M. oleifera* provocou um efeito contra diabetes em ratos; o efeito foi caracterizado pela presença de bioflavonoides capazes de modular a ação de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, tendo como resultado a liberação de insulina pelas células β no pâncreas.

Com relação à presença de lectinas, *M. oleifera* tem mostrado ser excelente fonte de obtenção dessas proteínas; já foram isoladas da espécie as lectinas WSMoL (SANTOS et al., 2005; COELHO et al., 2009), Mol (KATRE et al., 2008), cMol (SANTOS et al., 2009), e MOSL (ASADUZZAMAN et al., 2018), as quais foram submetidas a análises para uma diversidade de aplicações biotecnológicas (SANTOS et al., 2005; COELHO et al., 2009).

A Lectina Solúvel em Água da *Moringa oleifera*

A WSMoL, nomeada assim por apresentar solubilidade em água (do inglês, *Water Soluble Moringa oleifera lectin*), apresenta atividade hemaglutinante (AH) dependente de sítios de ligação a carboidratos, sendo essa AH reduzida (inibida) na presença de monossacáridos.



deos frutose e glicose, de trissacarídeo rafinose (formado por glicose, frutose e galactose) e da glicoproteína tiroglobulina (SANTOS et al., 2005; FERREIRA et al., 2011). Essa lectina apresenta AH ótima em pH 4,5, mas em pH 7,0 essa atividade se torna diminuída, provavelmente pelo equilíbrio de cargas positivas e negativas da proteína, sendo, dessa forma, caracterizada como uma proteína ácida, de aproximadamente 60 kDa (MOURA et al., 2016). A WSMoL integre com quitina; apresenta também sequências peptídicas similares a outras proteínas isoladas da *M. oleifera*, M02.1 e M02.2, conforme depositada no banco de dados NCBI (número de identificação gi|127215) (GASSENSCHMIDT et al., 1995; COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2012).

Entre as atividades biológicas já analisadas para a WSMoL, pode-se citar a atividade antioxidante (SANTOS et al., 2005), atividades larvicida e ovicida contra *A. aegypti* (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2012), atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (FERREIRA et al., 2011), o efeito não citotóxico em células mononucleares e o efeito citotóxico moderado em linhagens NCI-H292 (câncer de pulmão) e Hep-2 (câncer de laringe) (ARAÚJO et al., 2013).

Todas as propriedades bioativas de WSMoL já descritas deixam claro o seu potencial para diversos fins biotecnológicos e justificam a busca de novas aplicações para essa lectina.

NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES: ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PARASITÁRIO

O parasitismo gastrointestinal é a maior causa de danos à saúde animal em todos os sistemas de produção animal do mundo, principalmente quando se trata de regiões tropicais e subtropicais, sendo a economia drasticamente afetada (VIEIRA, 2005; SOTOMAIOR et al., 2009; COSTA et al., 2011; RÍOS-DE ÁLVAREZ et al., 2012a). No Brasil, os índices são altos, abrangendo grande parte do território nacional (SOUSA et al., 2013).

Tendo em vista que a caprinocultura é uma atividade sustentada em países em desenvolvimento, cujo objetivo principal é a produção de carne, de leite e de pele economicamente viáveis, são de interesse da área estudos direcionados a alternativas de controle de parasitoses (VIEIRA, 2005; SPRENGER et al., 2013).

Os principais tipos de endoparasitas de maior importância na criação de pequenos ruminantes são os agentes etiológicos pertencentes às espécies de coccídios do gênero *Eimeria* (que causam eimeriose) e NGI pertencentes à família Trichostrongylidae (que causam verminoses), sendo que as endoparasitoses causadas por esses agentes se desenvolvem nos animais dependendo de vários fatores, sejam fatores nutricionais, associados à espécie, à fisiologia ou à carga parasitária (VIEIRA, 2005; HOLSBACK et al., 2013).

Os caprinos e ovinos são parasitados pelos NGI *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) e *Trichostrongylus axei*, que se instalam no abomaso; as espécies *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides papillosus*, *Cooperia punctata*, *Cooperia pectinata* e *Bunostomum trigonocephalum* são parasitos do intestino delgado; já as espécies *Oesophagostomum columbianum*, *Trichuris ovis*, *Trichuris globulosa* e *Skrjabinema* sp. são encontradas predominantemente no intestino grosso (VIEIRA, 2005; COSTA et al., 2011). Entre esses nematóides, as espécies *Haemonchus contortus*, *Strongyloides papillosus*, *Trichostrongylus colubriformis* e *Oesophagostomum columbianum* são as de maior prevalência nos animais infectados e caracterizam-se como os nematóides de maior importância na produção de caprinos e ovinos (HOUNZANGBE-ADOTE et al., 2005; VIEIRA, 2005; HOULSBACK et al., 2013; SALLES et al., 2014).

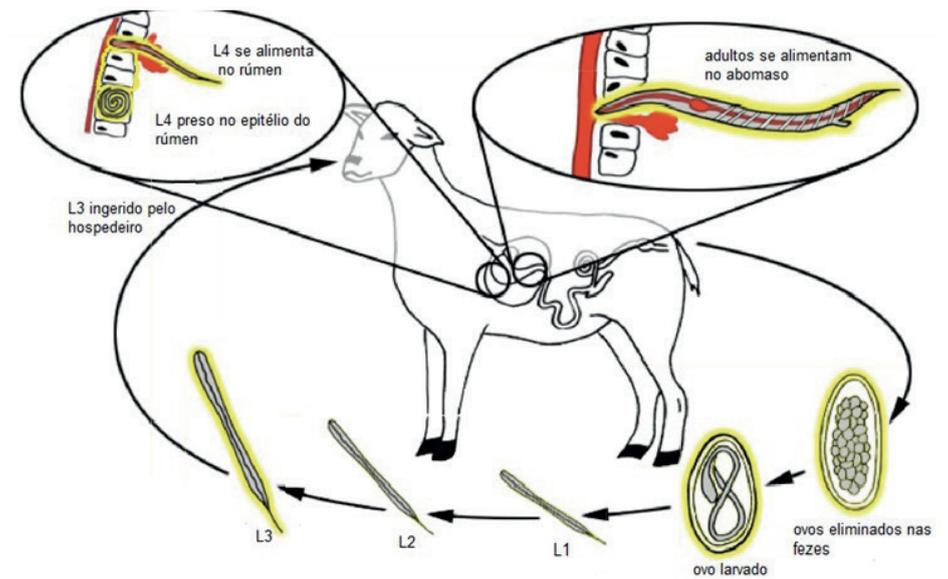
As condições ambientais nas quais os animais são mantidos, tais como umidade, temperatura e as características específicas das pastagens, são fatores que podem favorecer o desenvolvimento dos parasitos, havendo um aumento no índice de contaminação da pastagem (SOTOMAIOR et al., 2009).

Inicialmente, o ciclo de vida desses parasitos divide-se em fase de vida livre e fase parasitária (Figura 3). A fase de vida livre é caracterizada pela presença dos ovos nas fezes do animal, até a formação da larva em estágio L3 (estágio larval 3); os parasitos depositam ovos nas fezes existentes no intestino do animal, esse, por sua vez, quando evacua, libera os ovos na pastagem. Em aproximadamente 24 horas, os ovos eclodem para a larva em estágio L1 (estágio larval 1) quando essa, se alimentando de microrganismos, muda a sua cutícula para o estágio L2 (estágio larval 2) e, em seguida, para o estágio L3. A larva

em estágio L3 é a forma infectante e a sua formação dura em média de cinco a dez dias, em condições de temperatura e umidade adequadas (SOTOMAIOR et al., 2009; HOSTE et al., 2012).

A larva em estágio L3 apresenta-se com ação locomotora, permanecendo na pastagem da qual os animais se alimentam, ocorrendo a infecção. Assim, inicia-se a fase parasitária, e o nematoide passa a se localizar no sistema digestório do animal, onde se alimenta e realiza suas respectivas mudas, para o estágio L4 e depois para a forma adulta, que dura de dezoito a vinte e um dias. Os adultos acasalam-se e as fêmeas depositam ovos que serão eliminados nas fezes, dando continuidade ao ciclo do parasito (SOTOMAIOR et al., 2009).

Figura 3: Representação geral das fases do ciclo de vida dos nematoides gastrintestinais.



Fonte: Adaptado de Diagnosis of Veterinary Endoparasitic Infections (2016).

Nos animais, a sintomatologia apresenta-se por uma forte anemia ocasionada pela ação hematófaga, principalmente quando se trata de infecção pelo parasito da espécie *Haemonchus contortus*, que acarreta cerca de 80 % das infecções parasitárias em ovinos e caprinos, sendo caracterizado dentre os mais patogênicos dos parasitos gastrintestinais (VIEIRA, 2005; BATISTA et al., 2007; SOTOMAIOR et al., 2009; HOLSBACK et al., 2013). Além da anemia como o principal fator decorrente da parasitose por *Haemonchus contortus*, é também observado o crescimento retardado dos animais, a perda de peso, a diarreia, a formação de úlceras, a redução na produção de leite e carne, a diminuição da ingestão de alimentos, a diminuição da fertilidade reprodutiva e, dependendo da intensidade da infecção, pode chegar a haver taxas de mortalidade (SOTOMAIOR et al., 2009; HOLSBACK et al., 2013; SPRENGER et al., 2013).

A principal forma de controle epidemiológico é a utilização de medicamentos do grupo dos anti-helmínticos que interrompem, através de algum mecanismo de ação, o ciclo de vida dos parasitos (RÍOS-DE ÁLVAREZ et al., 2012a). Entre os anti-helmínticos, pode-se destacar os benzimidazóis (albendazol, fenbendazol e oxifendazol), os imidatiázóis (tetramisol e levamisol), as hidropirimidinas (pirantel e morantel), as lactonas macrocíclicas (ivermectina, abamectina, doramectina e moxidectina) e os salicilanilídeos (closantel, disofenol e nitroxinil) (COLES et al., 2006; SOTOMAIOR et al., 2009; SPRENGER et al., 2013; SALLES et al., 2014). Porém, o uso indiscriminado desses agentes é a principal causa de danos nocivos que levam à não eficácia do tratamento, causando resistência e efeitos acumulativos no ambiente (HOUNZANGBE-ADOTE et al., 2005; BIZIMENYERA et al., 2006; RÍOS-DE ÁLVAREZ et al., 2012a; SANTOS, F. et al., 2012; SPRENGER et al., 2013; ABREU et al., 2014).

A respeito do uso de tecnologias em busca de alternativas terapêuticas contra parasitos gastrintestinais, o uso de bioprodutos naturais destaca-se como benéfico, apresentando bons resultados para tal objetivo (BIZIMENYERA et al., 2006; SOTOMAIOR et al., 2009; BATA-TINHA et al., 2011; ABREU et al., 2014). Alguns trabalhos relataram o uso de extratos, frações proteicas e de lectinas com ação ovicida e larvicida, tanto para espécies de parasitos gastrintestinais, como para outras espécies (RÍOS-DE ÁLVAREZ et al., 2012a; 2012b; SALLES et al., 2014; HEIM et al., 2015). A ação antiparasitária de lectinas sobre larvas tem sido considerada como um efeito seletivo das lectinas por afinidade a glicoproteínas constituintes da cutícula desses parasitos, com as quais as lectinas se ligam, interferindo diretamente no desenvolvimento larval (RÍOS-DE ÁLVAREZ et al., 2012a; ABREU et al., 2014). O mesmo é sugerido com relação à ação ovicida, em que lectinas, interagindo com glicoproteínas do ovo, atuam, interferindo no processo de desenvolvimento da larva dentro do ovo, impedindo a eclosão do ovo ou o seu desenvolvimento embrionário (ABREU et al., 2014; SALLES et al., 2014).

Anti-helmínticos Sintéticos

O anti-helmíntico tiabendazol, pertencente à classe dos benzimidazóis, está em uso desde a década de 60, sendo o primeiro da sua classe a ser formulado (CHEHRESA, 1996; MELO & BEVILAQUA, 2005). Utilizado efetivamente como um químico sintético de amplo espectro frente a diversos nematoides, em diferentes fases de desenvolvimento (gêneros *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Ostertagia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Bunostomum*, *Strongyloides*, *Chabertia*, *Trichuris*), apresenta baixa toxicidade em mamíferos e alta

especificidade sobre nematoides, sendo de alta metabolização e representando baixo acúmulo de produtos metabólicos pós biotransformação (BROWN et al., 1961; CHEHRESA, 1996; SANTOS, 2013).

A especificidade do tiabendazol está associada ao seu mecanismo de ação, promovido pela interação do fármaco com a porção proteica ácida da β -tubulina, pertencente à composição dos microtúbulos nas células intestinais do nematódeo; essa interação inibe o processo de polimerização da tubulina na formação dos microtúbulos (os quais são constituídos por subunidades α e β da tubulina), ocasionando um transtorno molecular na formação do citoesqueleto. Em particular, o fármaco causa a interrupção na distribuição de vesículas intracelulares, causando mudanças celulares drásticas (CHEHRESA, 1996; MARTIN, 1997; MELO & BEVILAQUA, 2002; PEREIRA, 2011; SANTOS, 2013). A má formação citoesquelética impede a funcionalidade dos microtúbulos, os quais estão envolvidos com os processos de motilidade, mitose, absorção de nutrientes, secreção celular e com o transporte de moléculas intracelulares; portanto, a interação do químico sintético com a tubulina acarreta a perda da integridade de microtúbulos, provocando a morte dos nematoides (MARTIN, 1997; MELO & BEVILAQUA, 2005; PEREIRA, 2011; SANTOS, 2013).

O processo de interrupção na constituição de microtúbulos pelo fármaco não ocorre em mamíferos devido à ausência de interação do tiabendazol com a β -tubulina de mamíferos, a qual possui aspectos moleculares diferenciados da β -tubulina dos nematoides. Essa característica explica a ausência de toxicidade grave em mamíferos (SANTOS, 2013).

Além da interação com a β -tubulina, o tiabendazol também pode inibir o transporte de glicose por meio de sua ação inibitória sobre

a enzima fumarato redutase, modificando assim o metabolismo energético do nematódeo (MELO & BEVILAQUA, 2002; MELO & BEVILAQUA, 2005; PEREIRA, 2011).

A geração de energia em nematoides envolve processos fermentativos anaeróbios, em que a glicose capturada é reduzida a álcoois e a compostos orgânicos acidificados (CHEHRESA, 1996; MELO & BEVILAQUA, 2002). A carga energética do parasito é distribuída para atividades de motilidade e reprodução (CHEHRESA, 1996). O mecanismo de ação sobre o metabolismo da glicose foi o primeiro evidenciado para o tiabendazol, o qual provoca interrupção na bioquímica metabólica de carboidratos do parasito (CHEHRESA, 1996).

Também foi averiguado que há uma diminuição na produção de ovos pelos parasitos expostos ao químico em questão (MELO & BEVILAQUA, 2002; MELO & BEVILAQUA, 2005), provavelmente por acarretar disfunções genéticas/moleculares que interferem na produção de ovos durante o desenvolvimento dos nematoides adultos (LAING et al., 2013; SCHWARZ et al., 2013).

De forma geral, os imidazotiazóis atuam com um efeito similar ao da acetilcolina, causando paralisia nos vermes, impossibilitando a realização das atividades biológicas e promovendo a morte (ROEBER et al., 2013).

Já as lactonas macrocíclicas, avermectinas e milbemicinas interagem seletivamente com canais de cloreto. O fluxo de íons cloreto nos neurônios presumivelmente causa a paralisia e morte dos nematoides, por haver uma hiperpolarização no tecido, resultando em inibição e paralisia do organismo (MELO & BEVILAQUA, 2005).

As salicilanilidas, em sua maioria, atuam no processo de fosfo-

relação oxidativa, influenciando diretamente no mecanismo de geração de energia metabólica dos nematoides sensíveis a esses fármacos. Os organofosforados, usados em menor frequência, atuam diretamente na inibição da acetilcolinesterase, bloqueando a hidrólise da acetilcolina, resultando em paralisia espástica e eliminação do nematódeo do trato gastrointestinal do hospedeiro (MARTIN, 1997).

Dessa forma, contitui-se assim um leque de composições químicas no controle de NGI.

Resistência aos Anti-Helmínticos: Aspectos Gerais

A resistência de NGI é definida como sendo a capacidade de uma população de parasitos tolerar uma certa concentração do anti-helmíntico, normalmente letal para uma população de nematoides de mesma espécie, sensíveis ao mesmo anti-helmíntico. Esse aumento relativo no número de nematoides resistentes aos anti-helmínticos está associado à possibilidade de trocas gênicas entre os parasitos durante o próprio cruzamento; portanto, a hereditariedade é um importante fator no desenvolvimento da resistência, bem como fatores biológicos, ecológicos, genéticos e operacionais (MELO & BEVILAQUA, 2002; FORTES et al., 2011).

De forma breve, o uso dos anti-helmínticos pode levar ao desenvolvimento de mecanismos de resistência nos nematoides por dois mecanismos distintos: o mecanismo específico, que está relacionado com a atuação do químico sintético (farmacocinética) na sua forma de distribuição no organismo, e o mecanismo inespecífico, relacionado ao desenvolvimento de alterações nos receptores de atuação dos anti-helmínticos (sítios de atuação) (MELO & BEVILAQUA, 2005).

Nessa perspectiva, os anti-helmínticos, além de serem a forma mais difundida capaz de promover resistência nos nematoides, apresentam esses dois mecanismos distintos para acarretar a resistência (CHEHRESA, 1996; WOLSTENHOLME et al., 2004; MELO & BEVILAQUA, 2005). Assim, cepas de NGI resistentes aos anti-helmínticos estabelecem uma tolerância gênica, a qual é disseminada para a nova progênie, que se torna resistente às mesmas situações ocorridas e provocadas pelo químico sintético (MELO & BEVILAQUA, 2002).

Para os benzimidazois, a resistência é relatada desde o ano de 1965, difundindo-se por diversos países, principalmente os da América do Sul, bem como a África do Sul e Austrália (CHEHRESA, 1996; MELO & BEVILAQUA, 2002). No Brasil, o primeiro relato de resistência ao anti-helmíntico tiabendazol foi no Rio Grande do Sul, havendo uma prevalência de 97 % de resistência, em termos de propriedades de rebanhos (MELO & BEVILAQUA, 2002).

A permanência de biomoléculas imunogênicas variadas em populações de nematoides pode estar associada a uma estratégia evolutiva e adaptativa para o controle de populações heterogêneas na resposta imunológica ao hospedeiro. Por outro lado, uma perda de receptores associados ao anti-helmíntico (no caso a β -tubulina) em populações de nematoides está diretamente ligada ao surgimento da resistência ao tiabendazol (CHEHRESA, 1996).

Os estudos envolvendo os fatores genéticos associados a essa resistência são relatados desde a década de 1970; esses estudos apontam que as alterações na frequência gênica de uma população de nematoides resistentes são ocasionadas pela presença do anti-helmíntico, exigindo, muitas vezes, a utilização de uma maior concentração do químico sintético no controle aos parasitos (CHEHRESA, 1996).

A análise molecular dessa mudança genética revelou a existência de alelos específicos de um ou dois isotipos da fração da β -tubulina, ocorrendo uma troca do aminoácido fenilalanina por tirosina na β -tubulina, devido à alteração de sequência na posição 200 e/ou 167 do gene da tubulina (MELO & BEVILAQUA, 2002; SANTOS, 2013), bem como na posição 198, resultando na troca do aminoácido glutamato por alanina na sequência peptídica (SANTOS, 2013).

Já a resistência aos imidazotiazóis está associada a mudanças na farmacologia dos receptores da acetilcolina, em que os nematoides resistentes têm menor afinidade ao anti-helmíntico e mais sítios ligantes, o que ocasiona um aumento na propensão para a perda de sensibilidade do receptor ao anti-helmíntico (MELO & BEVILAQUA, 2002).

Também já foi relatada a resistência a outros anti-helmínticos (albendazol e parabendazol, ivermectina, oxfendazol e closantel), sendo esse fato de grande preocupação para a comunidade popular e científica, fortalecendo as pesquisas em busca de alternativas para o controle desses nematoides resistentes (MELO & BEVILAQUA, 2002).

Estratégias de Controle Alternativo

Nos últimos anos, a bioprospecção de produtos isolados de plantas vem crescendo exponencialmente, na perspectiva de triagens de compostos com atividades anti-helmínticas diversas (RÍOS-DE ÁLVAREZ et al., 2012a). Essa triagem está associada diretamente ao aumento da resistência aos químicos sintéticos, devido principalmente ao seu uso indiscriminado (CEZAR et al., 2008). Portanto, métodos de controle alternativo aplicáveis aos NGI são promissores, e pesquisas têm revelado novas formas de controlar esses parasitos (RÍOS-DE ÁLVAREZ et al., 2012a).

Cezar et al. (2008), bem como Hoste & Torres-Acosta (2011) validaram, em perspectiva de revisão literária, as principais formas de controle alternativo dos nematoides, definindo que há quatro principais categorias de controle alternativo: controle biológico; por resposta imune do hospedeiro; por manejo e por fitoterapia.

- Controle biológico: baseia-se no uso controlado de fungos e besouros nematófagos, os quais interrompem o ciclo de infecção provocado pelos nematoides e/ou compostos liberados por eles. A principal espécie fúngica dessa categoria é a *Duddingtonia flagrans* (CHARTIER & PORS, 2003; HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011).
- Imunologia do hospedeiro: a utilização de compostos com ação imunogênica, além de adjuvantes comerciais ou naturais (no caso, compostos da composição dos nematoides e/ou liberados por eles), está sendo investigada na perspectiva de formulação de vacinas para o controle, principalmente, do nematódeo da espécie *Haemonchus contortus* (BAKER et al., 2003; LAING et al., 2013).
- Controle por manejo: diminuir o número de animais na pastagem, o confinamento de animais mais sensíveis (como fêmeas em lactação e animais jovens) e a utilização de forrageiras mais altas para a alimentação dos animais (acima de 15 cm) são algumas alternativas de controle das parasitoses sem a utilização de químicos sintéticos. Medidas higiênico-sanitárias, como o planejamento da alimentação dos animais, do calendário de vacinações, e também o planejamento da higiene dos animais e das suas instalações são exemplos de medidas que podem ser adotadas nas propriedades a fim de diminuir o grau de infecção dos animais (SOTOMAIOR et al., 2009).

- Fitoterapia: a utilização de compostos isolados de vegetais, ou preparações extraídas dos mesmos, vem revelando de forma promissora fontes vegetais ricas, principalmente em taninos e proteínas do tipo lectinas, com ação anti-helmíntica. Essas preparações promovem efeitos nocivos aos parasitos, diminuindo a sua capacidade retroativa para uma nova infecção do hospedeiro (HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011; RÍOS-DE ÁLVAREZ et al., 2012a).

A utilização de metabólitos extraídos de plantas possui limitações expressas pela concentração do bioproduto, pelo mecanismo de ação do bioproduto e pelas condições ideais para a sua melhor eficácia (GITHIORI et al., 2006; NERY et al., 2009; RÍOS-DE ÁLVAREZ, 2009; NANDHINI & SUMATHI, 2014). Nesse sentido, apesar do crescente uso de metabólitos extraídos de plantas em pesquisas voltadas para o controle dos NGI, tais compostos vegetais ainda não apresentam uma eficácia maior ou equivalente, padronizada, em relação aos anti-helmínticos comerciais (RÍOS-DE ÁLVAREZ, 2009).

Entre os principais metabólitos extraídos de plantas com ação anti-helmíntica, destacam-se os taninos e as lectinas como promissores no controle dos NGI (RÍOS-DE ÁLVAREZ, 2009; HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011; NANDHINI & SUMATHI, 2014). Porém, em complexos metabólicos de plantas, geralmente há uma associação desses metabólitos, havendo a formação de complexos entre taninos e proteínas (T-P). Assim, os taninos provocam mais danos aos parasitos presentes no intestino, ou seja, àqueles que possuem o intestino como habitat (*Trichostrongylus colubriformis*). As proteínas, por sua vez, atuam principalmente nos parasitos do abomaso (*Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* (Stadelman, 1894) e *Trichostrongylus colubriformis*), onde o complexo T-P é dissociado pela mudança de pH

(o qual gira em torno de 3,5 no abomaso), havendo uma distinção funcional dos parasitos presentes nesses ambientes (HOSTE et al., 2006; RÍOS-DE ÁLVAREZ, 2009).

CAPÍTULO IV

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DA LECTINA SOLÚVEL EM ÁGUA (WSMoL) ISOLADA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*: MÉTODOS

Obtenção da WSMoL

A lectina denominada WSMoL foi cedida pelo grupo de pesquisa Bioquímica de Proteínas, coordenado pela Professora Doutora Luana Coelho, da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. A lectina foi isolada de acordo com o procedimento descrito por Coelho et al. (2009).

Obtenção dos Ovos de Nematoides Gastrintestinais de Caprinos

Foram selecionados, aleatoriamente e independentemente de raça e sexo, caprinos infectados naturalmente por NGI no Município de Mossoró, localizado no Estado do Rio Grande do Norte - RN, sob as coordenadas S 5° 11' 16'', W 37° 20' 38'', os quais apresentavam término do período de efeito residual do tratamento por fármaco de 30 dias após a última vermifugação (NICIURA et al., 2009). As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de cada animal, sendo armazenadas em sacos plásticos finos e estéreis e acondicionadas em caixas isotérmicas até serem transportadas ao Laboratório de Imunologia e Parasitologia Molecular (LIPAM) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

Identificação e Contagem de Ovos por Grama de Fezes – OPG

Inicialmente, triturou-se 4 g de amostras de fezes com o bastão de vidro e acrescentou-se 26 mL de solução hipersaturada de cloreto de sódio; a solução foi homogeneizada e peneirada. O material retido na peneira foi descartado e o filtrado foi pipetado até o preenchimento das duas células da câmara de McMaster. Em seguida, os ovos foram quantificados em microscópio óptico de luz em objetiva de 10x. O número de ovos encontrados na câmara foi multiplicado por 25, obtendo-se assim o número de ovos por grama de fezes (OPG).

Recuperação dos Ovos de Nematoides Gastrintestinais

As amostras que obtiveram um OPG igual ou superior a 100 foram selecionadas em um *pool* de fezes para o isolamento dos ovos. Sendo que o isolamento dos ovos de NGI de caprinos foi realizado como descrito por Hubert e Kerboeuf (1992). O *pool* de fezes foi homogeneizado em água, sendo essa solução peneirada com as seguintes malhas: 150; 100; 36 e 20 μm , respectivamente.

Em seguida, o material retido na última peneira foi lavado com água destilada e centrifugado em tubos Falcon de 15 mL (por 5 min, a 3.000 rpm, em temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso com solução hipersaturada de cloreto de sódio, sendo novamente centrifugado (por 5 min, a 3.000 rpm). Em seguida, a solução foi despejada na peneira de malha de 20 μm , lavada com água destilada e armazenada em tubo Falcon de 50 mL. Alíquotas de 40 μL foram postas em lâminas de vidro e a quantidade de ovos foi verificada em microscópio óptico de luz. Esse último passo foi realizado três vezes, sendo calculada a média da quantidade de ovos.

Teste da Eclodibilidade de Ovos – TEO

Esse método é utilizado para verificar a resistência parasitária ao anti-helmíntico sintético (tiabendazol) e/ou analisar moléculas bioativas com ação anti-helmíntica sobre ovos de nematoides, a fim de determinar se a biomolécula avaliada é capaz de inibir a eclosão dos ovos (CHAGAS et al., 2011).

Preparação do Anti-helmíntico Tiabendazol

Foram dissolvidos 0,032 g de tiabendazol em 3 mL de DMSO, formando assim uma solução denominada A. Em seguida, foram adicionados 97 mL de água destilada à solução A; posteriormente, 1 mL da solução A foi diluído em 99 mL de água destilada, obtendo-se uma solução de tiabendazol a $3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (BEZERRA, 2014).

Ensaio da Eclodibilidade

Esse método foi realizado conforme descrito por Coles e colaboradores (2006) e Ríos-de-Álvarez e colaboradores (2012a). Em placas estéreis de 24 poços, foi realizada uma diluição seriada de uma solução da WSMoL em água destilada, até se obter as concentrações lectínicas de 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81, 3,9 e $1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentrações finais para o volume final de cada poço, no ensaio), sendo em seguida adicionados 100 μL de solução de água destilada contendo os ovos dos nematoides (100 ovos/poço), obtendo-se, ao final, 500 μL por poço. Em cada ensaio, foram realizadas 5 repetições para cada concentração lectínica. As placas foram identificadas, lacradas com filme plástico e incubadas em B.O.D. (a 27°C , por 48 h); após a incubação, foram adicionadas duas gotas de lugol em cada poço, visando a paralisar o

processo de eclosão. Em seguida, foi realizada a quantificação (em lâminas de vidro) em microscópio óptico de luz, de ovos e de larvas em estágio L1 para cada tratamento.

O mesmo procedimento foi realizado para o controle negativo, contendo somente água destilada, e para o controle positivo, em que foi utilizado o anti-helmíntico tiabendazol na concentração de $3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparado em DMSO. Foram realizados 5 ensaios em períodos independentes.

Ensaio da Eclodibilidade com a WSMoL Inibida com Frutose

A inibição da WSMoL foi realizada conforme descrito por Santos et al. (2005), com modificações. Em vidraria do tipo Becker, foi preparada uma solução de frutose 0,2 M em água destilada, na qual foi adicionada a WSMoL; após 15 minutos, a solução da lectina inibida com a frutose foi utilizada para o ensaio de eclodibilidade.

100 ovos/poço foram adicionados em placas estéreis de 24 poços e, em seguida, completou-se o volume dos poços para um volume final de 500 μL com a adição da solução da lectina inibida com o carboidrato frutose a 0,2 M (nas mesmas concentrações finais da lectina usadas no ensaio sem inibição). Em cada ensaio, foram realizadas 5 repetições para cada concentração de lectina inibida. As placas foram incubadas em B.O.D. (a 27°C , por 48 h); após a incubação, foram adicionadas duas gotas de lugol em cada poço. Em seguida, foi realizada a quantificação de ovos e de larvas em estágio L1 para cada tratamento. Foram realizados 5 ensaios em períodos independentes.

Teste de Desenvolvimento Larval - TDL

Considerado um ensaio de sensibilidade para avaliar a eficácia de grupos químicos, esse teste é utilizado principalmente para o diagnóstico da resistência a anti-helmínticos da classe dos benzimidazóis (HUBERT & KERBOUEF, 1992; CHAGAS et al., 2011). Além disso, é também utilizado para avaliar a ação anti-helmíntica de substâncias químicas em teste, verificando-se a dose-resposta (HUBERT & KERBOUEF, 1992).

Produção de Meio Nutritivo Contendo *Escherichia coli*

A preparação do meio nutritivo contendo *E. coli* foi realizada de acordo com Chagas et al. (2011) e com Hubert e Kerbouef (1992).

Ensaio de Desenvolvimento Larval

Esse ensaio foi realizado conforme descrito por Hubert e Kerbouef (1992), bem como por Bizimenyera et al. (2006), com modificações. Procedeu-se o isolamento dos ovos, como descrito anteriormente. Em seguida, 100 ovos/poço foram adicionados em placas estéreis de 24 poços, obtendo-se um volume de 200 μL . Em seguida, 80 μL de solução de meio nutritivo contendo *E. coli* foram adicionados aos poços. As placas foram identificadas, lacradas com filme plástico e incubadas em B.O.D. (a 27 °C, por 48 h), até a eclosão dos ovos em larvas no estágio L1. Em seguida, foram preparadas em tubos de ensaio as soluções da WSMoL em diferentes concentrações (250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81, 3,9 e 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$, concentrações finais alcançadas para o volume final de cada poço, no ensaio), bem como a solução do controle positivo, o anti-helmíntico ivermectina (30,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em água destilada).

Por sua vez, o controle negativo foi realizado com água destilada.

Esses tratamentos foram distribuídos nos poços, obtendo-se ao final um volume de 500 μL por poço. Em cada ensaio, foram realizadas 5 repetições para cada concentração lectínica. As placas foram identificadas, lacradas com papel filme e incubadas em B.O.D. (a 27 °C, por 5 dias). Após a incubação, foram adicionadas duas gotas de lugol em cada poço. Em seguida, foi realizada a quantificação das larvas em estágio L1 e L3 para cada tratamento, em lâminas de vidro, no microscópio óptico de luz. Foram realizados 5 ensaios em períodos independentes.

Ensaio de Desenvolvimento Larval com a WSMoL Inibida com Frutose

A inibição da WSMoL foi realizada como descrito anteriormente, e a solução da lectina inibida com a frutose foi utilizada para o ensaio de desenvolvimento larval.

Assim, 100 ovos/poço + 80 μL de solução de meio nutritivo contendo *E. coli* foram adicionados em placas de 24 poços; após 48 h de incubação, completou-se o volume final de 500 μL em cada poço, com as soluções da lectina inibida com o frutose 0,2 M (nas mesmas concentrações finais da lectina, usadas no ensaio sem inibição). As placas foram incubadas em B.O.D. (a 27 °C, por 5 dias). Após a incubação, foram adicionadas duas gotas de lugol em cada poço. Em seguida, foi realizada a quantificação das larvas em estágio L1 e L3, para cada tratamento, em lâminas de vidro, no microscópio óptico de luz. Foram realizados 5 ensaios em períodos independentes.

Análise da Atividade de Proteases e de Tripsina

Esses ensaios objetivaram quantificar a atividade de proteases totais presentes em macerado de nematoides, na ausência e na presença da WSMoL, a fim de se verificar a possível interferência provocada pela lectina na atividade de proteases totais (AGRA-NETO et al., 2013).

A atividade de proteases foi determinada conforme descrito por Azeez et al. (2007), com modificações. Brevemente, 6 mL de solução aquosa contendo aproximadamente 4.350 larvas foram centrifugados (a 10.000 rpm, por 10 min); o sobrenadante foi reservado (proteínas secretadas) e o *pellet* foi ressuspenso em 4 mL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, macerado e centrifugado (a 10.000 rpm, por 10 min), sendo o sobrenadante denominado de extrato de larvas (proteínas não secretadas). A quantificação de proteínas no extrato (proteínas não secretadas) e no sobrenadante inicial (proteínas secretadas) de nematoides foi realizada pelo método de Bradford (1976). Em seguida, o extrato de larvas (proteínas não secretadas) (300 μ L; 48 μ g de proteína) foi imerso em 300 μ L de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, contendo 0,6% de azocaseína (50 μ L). Em seguida, 100 μ L de Triton X-100 foram adicionados à mistura, que foi incubada (por 3 h, a 37 °C).

Após a incubação, a reação foi encerrada com 200 μ L de ácido tricloroacético a 10% (TCA), sendo a mistura novamente incubada (por 30 min, a 4 °C) e, em seguida, centrifugada (a 10.000 rpm, por 10 min) e a absorbância verificada (366 nm). O mesmo procedimento foi realizado na presença da WSMoL (50 μ L; 1 mg mL⁻¹), bem como outro ensaio, utilizando o sobrenadante inicial (proteínas secretadas) (300 μ L; 21 μ g). Uma unidade de atividade de protease foi definida como a quantidade de enzima que promoveu um aumento de 0,01 na absorbância. O ensaio foi realizado em duplicata.

A atividade de tripsina foi determinada por incubação (por 30

min, a 37 °C) do extrato ou do sobrenadante inicial das larvas em tampão Tris-HCl (50 μ L), com 15 μ L ou 30 μ L de solução aquosa contendo WSMoL (1 mg mL⁻¹), Tris-HCl 0.1 M, pH 8,0 (120 μ L ou 105 μ L) e 8 mM de BApNA (N-benzoil-DL-arginil- ρ -nitroanilida, em 15 μ L). A atividade da tripsina foi determinada por medição de absorbância a 405 nm (leitor de microplacas) (KAKADE et al. 1969). Uma unidade de atividade de tripsina foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 nmol de BApNA por minuto. O controle foi realizado por incubação (por 60 min, 37 °C) de extrato ou sobrenadante inicial (50 μ L) com 135 μ L de Tris-HCl e 8 mM de BApNA (15 μ L). O ensaio foi realizado em duplicata.

Investigação da Localização da WSMoL Conjugada a FITC sobre Ovos e Larvas

A fluoresceína isotiocianato (FITC) se liga aos grupamentos amino-terminal ou aminas primárias das proteínas; permite visualizar e investigar as interações da proteína (lectina conjugada com fluoresceína isotiocianato) com os constituintes da amostra biológica a ser marcada, auxiliando a verificação da afinidade da molécula marcada com o material biológico analisado (RÍOS-DE ÁLVAREZ et al., 2012a; MARANGONI, 2012).

Esse método foi realizado conforme descrito por Marangoni (2012) e por Heim et al. (2015), com algumas modificações. Assim, 0,05 mg de FITC (em tampão PBS 0,01 M, pH 7,5) foram adicionados a 1 mg mL⁻¹ de WSMoL. O sistema foi incubado (por 1 h, sob agitação, a 4 °C, sob o abrigo de luz) e, em seguida, a solução de lectina conjugada (WSMoL-FITC) foi mantida a 4 °C (sob o abrigo de luz), até o momento da conjugação com o material biológico.

Para esse processo, foram utilizadas soluções de PBS contendo

ovos e/ou larvas de NGI, armazenadas em tubos eppendorf a 4 °C até o momento do ensaio. Inicialmente, tubos do tipo eppendorf contendo 100 µL da solução com ovos e/ou larvas dos NGI receberam uma solução de paraformaldeído a 4 %, em PBS 0,01 M. Os materiais foram incubados (por 30 min) e, em seguida, foram lavados com PBS, sendo então incubados com 100 µL da solução de conjugação WSMoL-FITC (por 1 h, com agitação a cada 20 min, a 4 °C). Após incubação, os materiais foram novamente lavados com PBS (2x). Em seguida, 40 µL foram distribuídos em lâminas de vidro, os materiais foram cobertos com lamínulas e seguiram para a observação em microscópio de fluorescência (Nikon) com câmera digital acoplada. Imagens foram capturadas e analisadas quanto à localização de ligação da WSMoL, com o programa MOTIC IMAGES PLUS® 2.0. O mesmo procedimento foi realizado com a solução de conjugação WSMoL-FITC contendo a lectina inibida com frutose a 0,2 M.

Análise dos Dados

Os dados do ensaio de eclodibilidade do ovo foram anexados em Excel para a quantificação da média de ovos e larvas em estágio L1, obtida para cada tratamento e repetição do ensaio. A percentagem de ovos não eclodidos foi analisada no programa SPSS Statistic (versão 20 para Windows®), utilizando o teste de análise de variância – ANOVA, e pós-teste de Tukey, considerando a significância de $p < 0,05$. A percentagem de ovos não eclodidos foi calculada pela fórmula (%) = (número de ovos / \sum número de ovos + número de larvas em L1) * 100.

Os dados do ensaio de desenvolvimento larval foram anexados em Excel para a quantificação da média de larvas em estágio L1 e em estágio L3, obtida para cada tratamento e repetição do ensaio. A percentagem das larvas não desenvolvidas foi analisada no programa SPSS

Statistic (versão 20 para Windows®), utilizando o teste de análise de variância – ANOVA, e pós-teste de Tukey, considerando a significância de $p < 0,05$. A percentagem de larvas não desenvolvidas foi calculada pela fórmula (%) = (número de larvas L1 / \sum número de larvas L1 + número de larvas em L3) * 100.

A concentração inibitória (IC50), para ambos os ensaios, foi calculada utilizando o programa Probit e o Software Statplus Pro 5.9.8 (AnalystSoft, Canada).

A diferença estatística entre a atividade de proteases na ausência e na presença da WSMoL foi avaliada pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$), seguido do pós-teste de Tukey (Programa GraphPad Prism® 5.0 para Windows®).

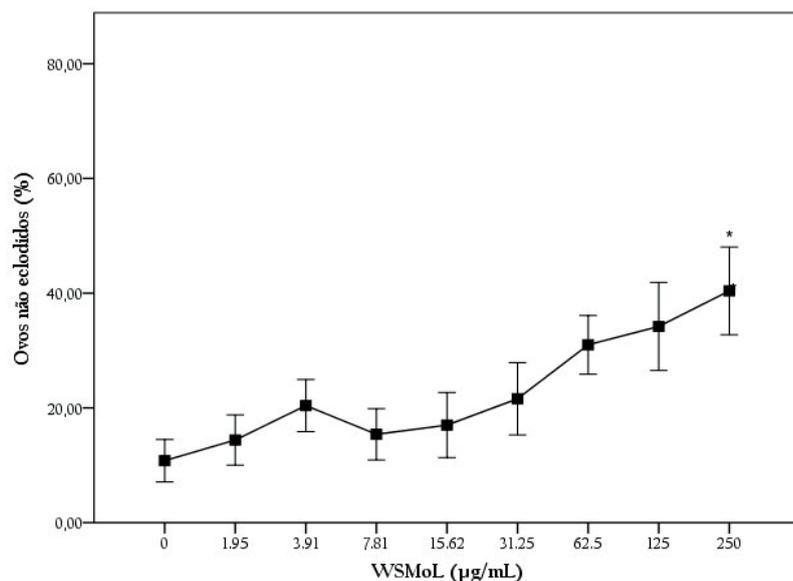


DISCUTINDO OS RESULTADOS DO EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DA WSMoL

O Ensaio de Eclodibilidade dos Ovos

O teste de eclodibilidade do ovo (TEO) revelou um potencial anti-helmíntico significativo promovido pela WSMoL, referente à ação de inibir a eclosão dos ovos para larvas em estágio L1. Foi verificado um percentual de 40,4 % de ovos não eclodidos na maior concentração lectínica avaliada ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$; $p=0,018$). Para a menor concentração lectínica avaliada ($1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$), houve uma percentagem de ovos não eclodidos de 14 % (Figura 4).

Figura 4: Atividade anti-helmíntica da WSMoL promovendo inibição da eclosão de ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos ($p<0,05^*$). ■ WSMoL.



Fonte: Dados do Autor.

Río-de Álvarez e colaboradores (2012a) defendem que lectinas de plantas podem ser utilizadas como uma alternativa eficaz no controle de NGI de caprinos, reduzindo a utilização de químicos sintéticos. Essas proteínas interferem positivamente na imunidade do hospedeiro dos parasitos através da interação lectina-hospedeiro, sendo consideradas como um adjuvante essencial no controle natural pelo hospedeiro dos NGI (Ríos-de Álvarez, 2009).

Ríos-de Álvarez (2009) foi quem efetivamente iniciou as pesquisas envolvendo a avaliação de lectinas puras, isoladas de plantas, quanto à atividade anti-helmíntica em nematoides que habitam o abomaso dos animais (*H. contortus*, *T. circumcincta*), relatando a ausência de estudos, até o ano de 2009, sobre o potencial das lectinas nessa área. A autora levou em consideração a capacidade imunogênica das lectinas como o principal fator que a incentivou a dar início às análises experimentais.

É importante ressaltar que, neste estudo, foi analisada a carga total de parasitos gastrintestinais de animais naturalmente infectados. Ou seja, o ambiente (pastagem) em que os animais se encontravam estava infectado com os parasitos, com consequente infecção do hospedeiro (obedecendo ao ciclo de vida do parasito).

Levando em consideração os cinco ensaios realizados nessa etapa experimental, repetidos em tempos independentes (em quintuplicata, cada), a concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ da WSMoL foi a que apresentou um efeito inibitório significativo ($p=0,018$) de 40,4% sobre a eclosão de ovos de (NGI) (Figura 4).

O efeito anti-helmíntico promovido pela WSMoL sobre a eclosão de ovos de NGI de caprinos foi comparado ao efeito que a mesma possui na fase de desenvolvimento de larvas e na eclosão de ovos do

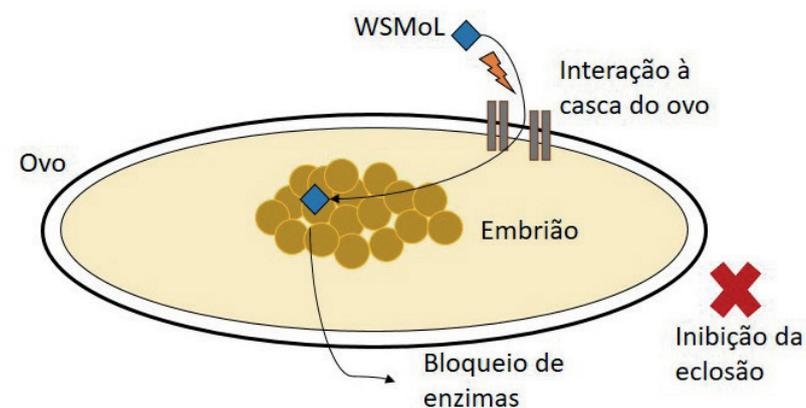
A. aegypti, verificado por Coelho et al. (2009) e também por Santos e colaboradores (2012). Foi proposto por Santos e colaboradores (2012) que a WSMoL interfere no desenvolvimento embrionário das larvas do parasito *A. aegypti*, por penetrar no ovo, havendo uma relação específica e de afinidade da lectina com a composição do embrião, provocando sua morte. De fato, os compostos com ação ovicida têm capacidade de interromper o desenvolvimento do embrião, prejudicar a sobrevivência da larva formada dentro do ovo e bloquear o processo de eclosão (GOVINDARAJAN & KARUPPANNAN, 2011; SANTOS et al., 2012).

Os autores também destacaram afinidade da lectina WSMoL pelo polissacarídeo de prevalência na composição do ovo, a quitina (uma vez que a WSMoL é quitina-ligante), podendo essa afinidade promover uma ruptura na estrutura do ovo, com efeitos nocivos, impedindo assim a eclosão (SANTOS et al., 2012).

Diante dos resultados observados neste estudo, alguns aspectos podem ser sugeridos quanto ao modo de interação da WSMoL com os ovos dos NGI de caprinos, levando à interrupção da eclosão. Os ovos dos NGI de caprinos também apresentam na sua composição o polissacarídeo quitina, além de compostos lipídicos, proteicos e o vitelo¹ (MANSFIELD et al., 1992). Sabe-se que a WSMoL apresenta afinidade pelo polissacarídeo quitina (SANTOS et al., 2005; COELHO et al., 2009), caracterizando-se essa afinidade como um aspecto importante para a formulação de um possível mecanismo de interação da WSMoL com os ovos dos NGI (Figura 5).

1. Vitelo: é uma reserva de nutrientes existente nas células dos ovos, servindo como alimento para o embrião.

Figura 5: Esquema do possível mecanismo de ação da WSMoL, sugerido pelos autores, sobre a eclosão de ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos.



Fonte: Dados do Autor.

A afinidade da biomolécula por constituintes moleculares do ovo pode desencadear uma ação interferente em sua composição, provocando desequilíbrio funcional na parte espessa do ovo, bem como na parte interna, acarretando parada no desenvolvimento do embrião (NERY et al., 2009; FERREIRA et al., 2009; ABREU et al., 2014).

Além das possíveis interferências sugeridas, como a ação da lectina sobre carboidratos da composição do ovo, a lectina também pode vir a se ligar a lipoproteínas da membrana do ovo, acarretando problemas na permeabilidade e equilíbrio osmótico, e promovendo efeitos nocivos ao desenvolvimento do embrião (VARGAS-MAGAÑA et al., 2014).

Molan e colaboradores (2002) sugeriram que enzimas (aminopeptidases, lipases, metaloproteases, quitinases, β -glicosidases) envolvidas no processo natural de degradação da casca do ovo, bem como no desenvolvimento do embrião, na fase de eclosão, podem ser inibidas

pelos compostos de plantas com ação anti-helmíntica. Essa inibição promoveria uma completa parada no processo de eclosão, além da conseqüente inviabilidade do nematoide.

Há também enzimas do tipo peptidases envolvidas na embriogênese, atuando como mediadores de sinalização durante esse processo. Se ocorrer uma ligação do tipo competitiva da lectina nos receptores associados a essa sinalização, pode resultar em uma parada ou em um retardo no desenvolvimento do embrião (CRAIG et al., 2007), o que geralmente acontece na fase de blástula (NERY et al., 2009).

Em um estudo realizado com o extrato aquoso das folhas de *M. oleifera*, avaliando o efeito sobre a eclosão de ovos de nematoides recuperados de ovinos, foi verificada uma inibição de 57 % da eclosão. Nesse mesmo estudo, verificou-se também que o extrato aquoso interrompeu a migração de larvas dos NGI, mostrando que o composto analisado interferiu na motilidade da larva, promovendo disfunção motora e até a morte. Os autores atribuíram esse efeito à presença de metabólitos com propriedades antiparasitárias, como os taninos, os terpenos, os flavonoides e as lectinas (ABREU et al., 2014).

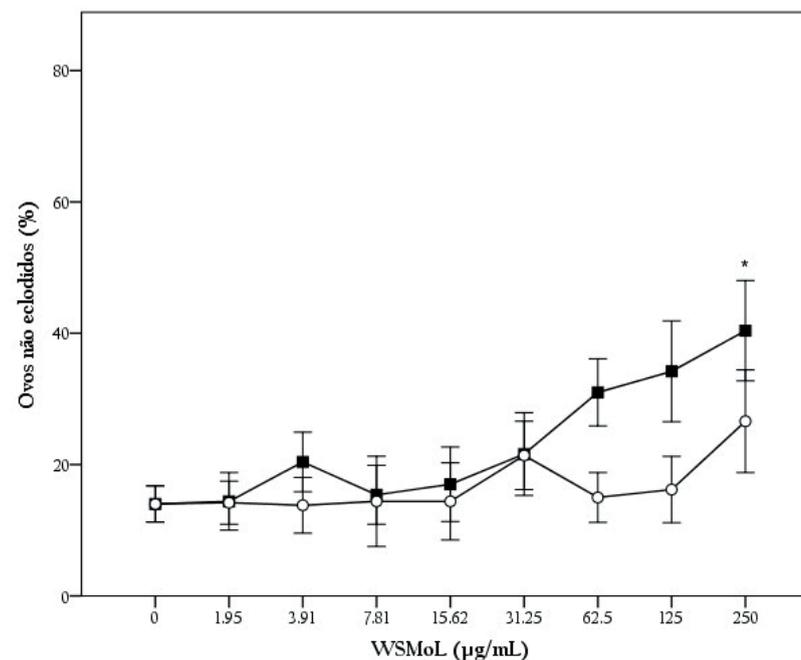
A espécie *M. oleifera* apresenta metabólitos secundários de diversos tipos, como alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenoides, saponinas, taninos e antraquinonas (FAHEY, 2005; MARTÍN et al., 2013; YADAV et al., 2013), bem como metabólitos do tipo lectinas e inibidores de proteases (SANTOS et al., 2005; KATRE et al., 2008; SANTOS et al., 2009; PONTUAL et al., 2014).

Salles e colaboradores (2014) demonstraram que frações proteicas de sementes de *M. oleifera* apresentam efeito ovicida sobre NGI de ovinos, por conter moléculas que interferem no ciclo de vida do nematoide, podendo interromper o desenvolvimento embrionário, interferir na sobrevivência da larva dentro do ovo e/ou bloquear a eclosão. Os

autores sugeriram também que a molécula presente na fração formulada, com ação ovicida, tratava-se de uma proteína solúvel em água e que poderia se tratar da mesma proteína já avaliada com ação ovicida e larvicida contra *A. aegypti* por Coelho e colaboradores (2009) e também por Santos e colaboradores (2012) (SALLES et al., 2014).

A eclodibilidade dos ovos também foi verificada com a WSMoL inibida; o intuito foi o de se verificar o envolvimento da especificidade de seus sítios de ligação a carboidratos na ação anti-helmíntica da lectina sobre os ovos dos NGI. A percentagem de ovos não eclodidos foi reduzida significativamente; a lectina inibida com o carboidrato diminuiu o seu potencial anti-helmíntico específico em torno de 33 % (Figura 6).

Figura 6: Efeito ovicida da WSMoL, na presença do inibidor frutose, sobre ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos ($p < 0,05^*$). ■ WSMoL; ○ WSMoL inibida com 0,2 M de frutose.



Fonte: Dados do Autor.

Ríos-de Álvarez e colaboradores (2012a) observaram também uma significativa redução na especificidade da lectina PHA-E3L em atuar como inibidora da eclosão de ovos de NGI na presença de carboidratos inibidores da atividade específica da lectina. Houve uma redução na sobrevivência de larvas de *H. contortus in vitro*, justificada pela especificidade da lectina a carboidratos presentes nas larvas e/ou pela reorganização molecular dependente de carboidratos, promovendo disfunção no nematoide.

Quando se faz uma sobreposição dos resultados obtidos no que diz respeito às percentagens de ovos não eclodidos, acarretados pela WSMoL livre e pela WSMoL inibida, torna-se mais evidente a perda funcional da biomolécula sobre a eclosão dos ovos desses nematoides (Figura 6), deixando claro que a funcionalidade anti-helmíntica da WSMoL sobre a eclodibilidade dos ovos de NGI de caprinos está diretamente relacionada ao(s) sítio(s) de interação da lectina ao carboidrato inibidor utilizado, no caso, a frutose.

Santos e colaboradores (2005) e também Araújo e colaboradores (2013) verificaram a especificidade da WSMoL em relação ao carboidrato frutose, o qual promove uma diminuição da atividade hemaglutinante específica² da lectina, comprovando a especificidade da WSMoL por frutose. A respeito dos domínios de reconhecimento a carboidratos da WSMoL, sabe-se pouco; a lectina possui a sua atividade hemaglutinante específica reduzida na presença de frutose (0,2 M) e da glicoproteína tiroglobulina (0,5 mg mL⁻¹) (SANTOS, et al., 2005; ARAÚJO et al., 2013).

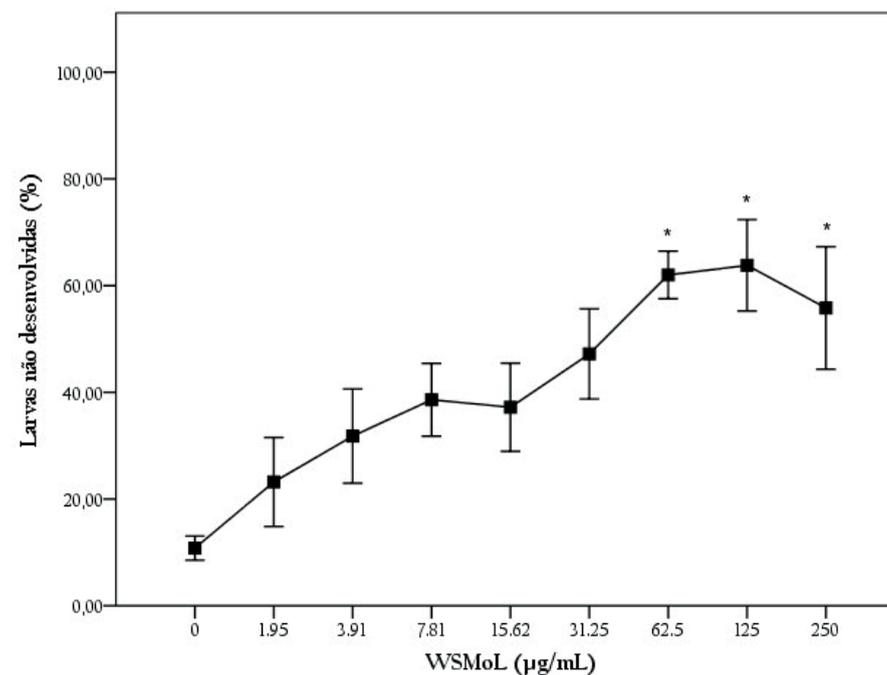
2. A atividade hemaglutinante específica (AHE) da lectina é determinada pela divisão do título de atividade hemaglutinante pela concentração proteica da solução da lectina: AH/concentração (mg/mL).

O Ensaio de Desenvolvimento Larval

A WSMoL apresentou efeito anti-helmíntico sobre as larvas de NGI de caprinos, dado significativo para as concentrações de 250, 125 e 62,5 µg mL⁻¹ (p<0,01). A lectina promoveu uma ação inibitória no desenvolvimento de larvas em estágio L1 para o estágio L3, com percentuais de 55,8, 63,8 e 62,5 %, respectivamente (Figura 7).

Figura 7: Atividade anti-helmíntica da WSMoL promovendo inibição do desenvolvimento de larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos, do estágio larval L1 ao

L3 (p<0,01*). ■ WSMoL



Fonte: Dados do Autor.

Em relação à ação interferente da WSMoL no desenvolvimento de larvas, Coelho e colaboradores (2009) verificaram a especificidade

da WSMoL sobre larvas de *A. aegypti*, mostrando que a lectina interferiu negativamente em seu desenvolvimento e promoveu uma mortalidade efetiva de 80 %, a uma concentração de 0,23 mg mL⁻¹. No estudo, foram verificadas alterações morfológicas no intestino das larvas, ação justificada pela capacidade da lectina em provocar desequilíbrio tanto enzimático, como em receptores de células intestinais. Os autores afirmaram que a estrutura nativa da WSMoL é de extrema importância para garantir a sua especificidade larvicida, bem como a sua afinidade a carboidratos, como a quitina (COELHO et al., 2009).

Ferreira e colaboradores (2009) demonstraram a atividade larvicida sobre *A. aegypti*, de fração obtida a partir de sementes de *M. oleifera*, promovendo uma mortalidade de 99 % das larvas (na concentração de 5200 µg mL⁻¹); a amostra não impediu a eclosão dos ovos, mas impediu que as larvas em estágio L1 sobrevivessem após a eclosão, sugerindo-se que o efeito foi ocasionado pela presença de proteína na fração testada.

Agra-Neto e colaboradores (2014) observaram que a WSMoL promoveu um efeito larvicida em *A. aegypti* em estágio L4 (51,6 %), com uma concentração letal (LC50) de 0,197 mg mL⁻¹, similar aos resultados obtidos por Coelho e colaboradores (2009).

Abreu e colaboradores (2014), por sua vez, sugeriram que o efeito anti-helmíntico promovido pelo extrato de folhas de *M. oleifera* em seus estudos se deu pela interação de compostos com glicoproteínas presentes na cutícula das larvas, matando-as.

Nesse estudo, a concentração inibitória (IC50) da WSMoL sobre o desenvolvimento das larvas de NGI foi de 78,22 µg mL⁻¹, não havendo uma correlação, em termos de concentração lectínica, com os dados encontrados pelos estudos realizados com larvas de *A. aegypti*. A maior percentagem de larvas não desenvolvidas (63,8 %; p=0,001)

foi verificada na concentração de 125 µg mL⁻¹ da lectina (Figura 7). Já nas concentrações de 250 µg mL⁻¹ e 62,5 µg mL⁻¹, foi observada uma percentagem de larvas não desenvolvidas de 62 % (p=0,002) e 55,8 % (p=0,008), respectivamente.

Hoste e colaboradores (2006) realizaram um levantamento de bioativos de plantas com propriedades anti-helmínticas, e verificaram que a maioria dos trabalhos cita uma relação de dose dependência na ação promovida pelos compostos estudados; porém, a maioria dos trabalhos relata os taninos condensados como os responsáveis pelo efeito acarretado ao nematoide.

Ríos-de Álvarez e colaboradores (2009) afirmaram não haver estudos, até o ano de 2009, com lectinas apresentando ação anti-helmíntica sobre larvas de NGI de pequenos ruminantes. Mesmo assim, a maioria dos trabalhos que verificaram, ao longo dos anos, a ação de produtos naturais com ação anti-helmíntica em pequenos ruminantes destacou que, provavelmente, é a presença de taninos e/ou proteínas que desencadeia tal efeito (NERY et al., 2009; 2010; HOSTE, et al., 2006; 2011; 2012; CARVALHO, 2012; ABREU, 2014).

Os mecanismos de ação evidenciados por esses estudos sugerem que o composto químico com ação anti-helmíntica interage com proteínas e receptores presentes na cutícula da larva, bem como em células intestinais (com glicanos nelas presentes), alterando propriedades físicas e químicas desses receptores, e deixando sua funcionalidade bioquímica comprometida (HOSTE et al., 2006; NERY et al., 2010; CARVALHO et al., 2012; ABREU et al., 2014; HEIM et al., 2015).

A cutícula das larvas é formada essencialmente por colágeno rico em prolina e hidroxiprolina (aminoácidos que conferem resistência/dureza) (HOSTE et al., 2006; CRAIG et al., 2007). Cavidade bucal, vulva, cloaca e esôfago são regiões funcionais em nematoides, que

também apresentam receptores responsáveis pelo reconhecimento de carboidratos (TOBATA-KUDO et al., 2005; HOSTE et al., 2006; RÍO-S-DE ÁLVAREZ, 2009).

Nos estágios de desenvolvimento larval de NGI (L1 – L3), há um espessamento natural da cutícula. Em larvas no estágio L3, essa cutícula se torna mais espessa, conferindo à larva uma resistência física e molecular durante o processo de infecção do hospedeiro; dessa forma, compostos que interfiram na composição da cutícula de nematoides podem oferecer promissoras evidências na busca de agentes com ação nematicida (GRAIG et al., 2007).

Coles e colaboradores (2006) afirmaram que o uso de proteínas do tipo lectinas no controle de NGI poderá vir a auxiliar nas estratégias de controle, visto que há um índice crescente da resistência aos anti-helmínticos sintéticos.

Ríos-de Álvarez e colaboradores (2012a), por seu turno, caracterizaram a ação da lectina WGA sobre larvas de *Teladorsagia circumcincta* e verificaram que a lectina interferiu na integridade da cutícula da larva, ocasionando danos com conseqüente parada do desenvolvimento larval.

Heim e colaboradores (2015) analisaram o efeito promovido por lectinas isoladas de fungos (CGL2, MOA, AAL, CCL2 e CGL3) sobre o desenvolvimento de larvas de *H. contortus in vitro*. Os autores verificaram que 1 µg mL⁻¹ das lectinas CGL2, AAL e MOA foi capaz de promover uma inibição do desenvolvimento das larvas em 72 % (p=0,016), 88 % (p=0,004) e 50 % (p=0,014), respectivamente; a lectina CCL2, na concentração de 40 µg mL⁻¹, promoveu 95 % de inibição (p<0,001), havendo, para todas as lectinas, uma relação de dose dependência.

Para tal efeito anti-helmíntico de lectinas fúngicas, foi sugerido

que as lectinas analisadas apresentam mecanismos diferenciados quanto a sua atuação nos nematoides; sugeriu-se que há uma relação com a superfície dos nematoides, capaz de promover um efeito larvostático, e uma disfunção biológica na larva (reabsorção de nutrientes), pela associação das lectinas com células intestinais ricas em glicanos, havendo a parada do desenvolvimento larval no estágio L1 (HEIM et al., 2015).

Foi identificada na espécie *H. contortus* a presença de enzimas intracelulares ligadas à ação detoxificante, associadas ao aumento de CYP450³ (LAING et al., 2013). Dessa forma, a ausência de lipofilicidade da WSMoL pode ser uma vantagem funcional, a respeito da ação anti-xenobiótica sobre moléculas lipofílicas já relatada em NGI (LAING et al., 2010).

Em experimentos *in vivo*, Ríos-de Álvarez (2009) observou que houve uma redução da carga parasitária que habita o abomaso de ovinos quando administrados metabólitos secundários de plantas ao animal, não havendo, no entanto, ação interferente em larvas no estágio L4 e na fase adulta, evidenciando, assim, a utilização promissora de lectinas contra NGI de ruminantes. Lectinas resistentes às mudanças ocasionadas no rúmen do animal, bem como no abomaso e no intestino, são ótimas candidatas para serem avaliadas em estudos *in vivo* no que diz respeito à ação contra nematoides nessas regiões do corpo do hospedeiro (Ríos-de Álvarez, 2009).

A farinha das sementes de *M. oleifera* já foi utilizada como suplemento na alimentação de ovinos, havendo relato de melhora na fermentação no rúmen, sem promover alterações no processo de digestão (BEN SALEM & MAKKAR, 2009).

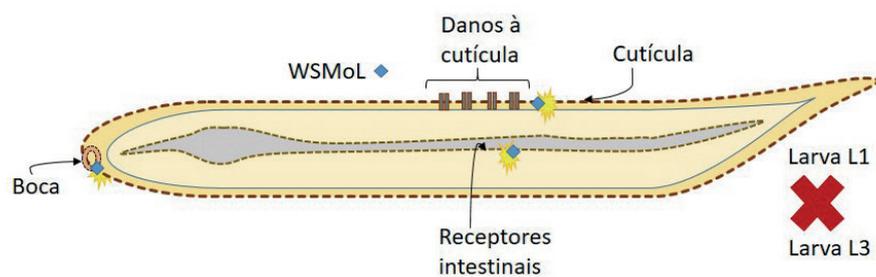
É importante discriminar as características valiosas da WSMoL

3. CYP450: citocromo P450 são enzimas diversificadas, associadas ao metabolismo de xenobióticos com características lipofílicas.

quanto aos aspectos de possível atuação *in vivo*. A WSMoL resiste e tem uma boa funcionalidade em pH ácido (SANTOS, et al., 2005), o que auxiliaria a ação no trato intestinal de pequenos ruminantes, em especial no abomaso (em que o pH se mantém em torno de 3,5). A lectina não apresenta toxicidade em testes como o de Ames/Kado, em células de mamífero e em análises de hemólise (ARAÚJO et al., 2009). Além disso, a WSMoL se caracteriza por sua solubilidade em meio aquoso (SANTOS, et al., 2005) e pela padronização para a sua obtenção (cromatografia de afinidade em quitina). Tais características tornam a WSMoL promissora para futuras análises a fim de se verificar seu efeito sobre a carga parasitária em pequenos ruminantes *in vivo*.

Diante do exposto, o mecanismo de ação da WSMoL sobre o desenvolvimento de larvas de NGI de caprinos foi sugerido (Figura 8):

Figura 8: Esquema do possível mecanismo de ação da WSMoL, sugerido pelos autores, sobre o desenvolvimento de larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos.



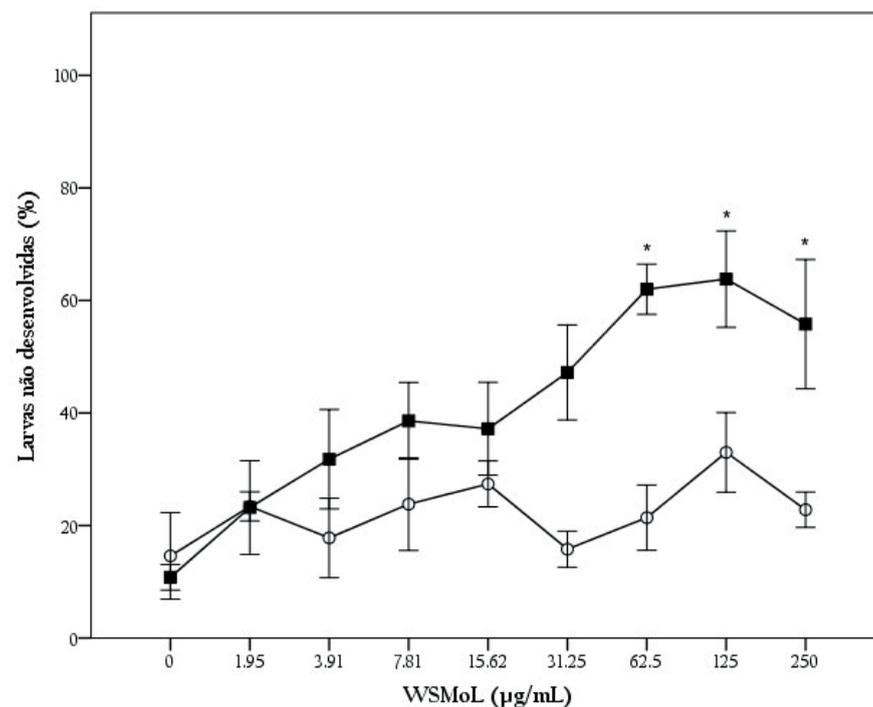
Fonte: Dados do Autor.

A lectina inibida com o carboidrato frutose (a 0,2 M) perdeu a sua especificidade de ação sobre as larvas de NGI, havendo uma diminuição no percentual de larvas não desenvolvidas. Portanto, na presença do inibidor frutose, a WSMoL diminuiu drasticamente a sua ação anti-helmíntica em torno de 48,4 %, comparando-se ao valor do maior

efeito inibitório provocado pela lectina livre (64 %) (Figura 9).

Tobata-Kudo e colaboradores (2005) associaram a desordem no funcionamento de nematoides da espécie *Strongyloides ratti* à especificidade de lectinas por carboidratos presentes em receptores terminais e na cutícula dos parasitos.

Figura 9: Inibição da atividade anti-helmíntica da WSMoL, na presença do inibidor frutose, sobre larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos ($p < 0,05^*$). ■ WSMoL; ○ WSMoL inibida com 0,2 M de frutose.



Fonte: Dados do Autor.

Os resultados obtidos em relação ao efeito do inibidor (frutose) sobre a ação anti-helmíntica de WSMoL em larvas corrobora os dados encontrados por Ríos-de Álvarez (2009), sugerindo que a ação anti-

-helmíntica da lectina analisada está associada, de forma direta, à sua afinidade por carboidratos específicos.

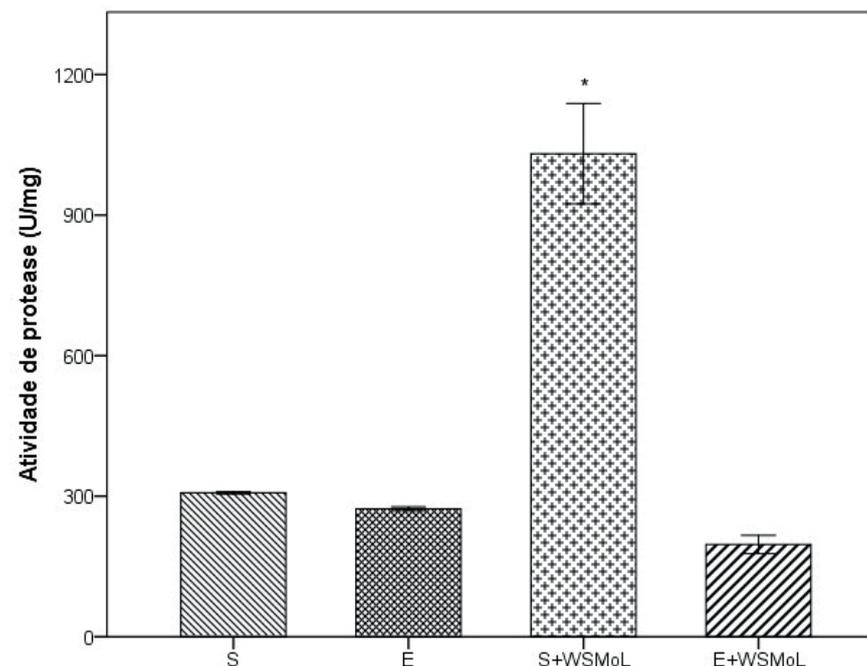
Atividade de Proteases e de Tripsina

A dosagem de proteínas realizada pelo método de Bradford (1976) mostrou que, no sobrenadante inicial obtido a partir dos NGI, havia $0,070 \text{ mg mL}^{-1}$ (proteínas secretadas) e, no extrato obtido a partir da maceração e centrifugação das larvas dos nematoides, havia $0,160 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas totais (proteínas não secretadas). Assim, a quantidade de proteína por amostra foi definida ($21 \text{ } \mu\text{g}$ em $300 \text{ } \mu\text{L}$ de sobrenadante inicial; $48 \text{ } \mu\text{g}$ em $300 \text{ } \mu\text{L}$ de extrato de larvas).

A atividade de proteases foi determinada com o uso do substrato azocaseína e com a liberação de peptídeos menores com o uso do ácido tricloroacético. A atividade de proteases no sobrenadante dos NGI (proteínas secretadas) foi quantificada em $307,14 \text{ U/mg}$; a atividade de proteases no extrato de larvas dos NGI (proteínas não secretadas) foi quantificada em 273 U/mg .

Na presença da WSMoL, a atividade das proteases secretadas pelos nematoides sofreu alterações ($p < 0,05$; 1031 U/mg), aumentando de forma significativa (Figura 10). Por outro lado, as proteases não secretadas (presentes no extrato de larvas) não sofreram alterações significativas na presença da WSMoL ($p > 0,05$; 197 U/mg):

Figura 10: Atividade de proteases de nematoides gastrintestinais de caprinos na presença da lectina WSMoL. Atividade de proteases secretadas (S) e de proteases não secretadas (E) na ausência ou presença da WSMoL na concentração de $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05^*$).



Fonte: Dados do Autor.

Agra-Neto e colaboradores (2014) analisaram a resistência da WSMoL frente à ação proteolítica de proteases liberadas por larvas de *A. aegypti* e observaram que a lectina apresenta resistência à ação proteolítica, bem como apresenta ação interferente em enzimas digestivas.

Proteases do tipo metalopeptidases, serino-peptidases e cisteíno-peptidases são essenciais no processo de desenvolvimento da cutícula da larva, ou no processo de muda; portanto, agentes que apresentem resistência a essas proteases podem ser bons agentes anti-helmínticos (RUIZ et al., 2003; HOSTE et al., 2006; GRAIG et al., 2007). De acordo com o que foi observado neste estudo, a WSMoL não alterou a ação proteolítica de proteases não secretadas (E+WSMoL) dos NGI de caprinos ($p > 0,05$) (Figura 10); a WSMoL não interferiu de forma

significativa na atividade dessas enzimas.

Outro fator de relevância para se explicar a ação nociva dos NGI ao hospedeiro é a produção e secreção de proteases envolvidas no processo de infecção do hospedeiro e nas funcionalidades bioquímicas durante o processo de desenvolvimento larval (do estágio L1 ao L3) (KARANU et al., 1993; 1997; MULEKE et al., 2006; CRAIG et al., 2007; SALLES et al., 2014).

Apesar de não terem sido determinados quais tipos de proteases estavam presentes nas amostras obtidas a partir dos nematoides, cisteíno-proteases foram relatadas como sendo as de maior prevalência (na excreção e secreção) em nematoides da espécie *H. contortus* (KARANU et al., 1997), havendo, para a sua expressão, uma associação de multigenes (mais de 10 membros na família) (KARANU et al., 1997).

As proteases dos tipos metaloproteases e cisteíno-proteases, além de estarem envolvidas em processos funcionais nos nematoides, estão correlacionadas à digestão da hemoglobina (como a catepsina B, gene *cb1*) e à atividade anticoagulante (LAING et al., 2013).

A WSMoL ocasionou, neste estudo, um aumento da atividade enzimática do total de proteases secretadas pelos NGI de caprinos, provavelmente por aumentar a afinidade das proteases secretadas aos seus substratos (MACEDO et al., 2007).

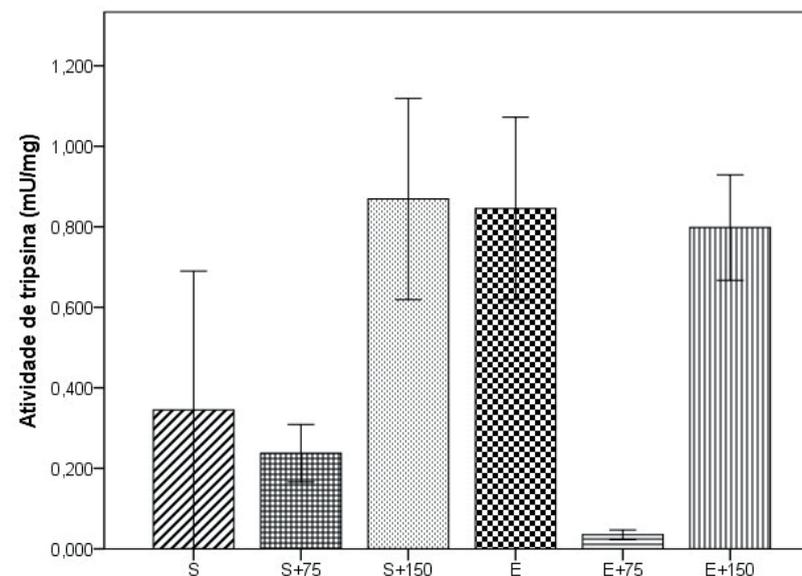
Mudanças envolvendo a diminuição ou o aumento na atividade de enzimas também podem provocar uma desordem funcional nos nematoides (KARANU et al., 1993; 1997; AGRA-NETO et al., 2014). Dessa forma, provavelmente, há uma relação entre a capacidade anti-helmíntica da WSMoL, durante o processo de desenvolvimento larval, e as proteases secretadas pelos nematoides. Uma evidência para isso é o estudo realizado com frações formuladas a partir das sementes de *M. oleifera*, as quais promoveram ação interferente em cisteíno-proteases

do tipo catepsina B, obtidas comercialmente (BIJINA et al., 2011).

A atividade de tripsina no extrato das larvas (proteínas não secretadas) foi quantificada em 0,845 mU/mg, já a atividade de tripsina no sobrenadante inicial (proteínas secretadas) foi quantificada em 0,345 mU/mg, revelando baixa atividade enzimática (Figura 11).

Na presença da WSMoL (15 μ L; 75 μ g mL⁻¹), a atividade de tripsina no extrato das larvas diminuiu bruscamente (0,035 mU/mg); porém, esse efeito não foi significativo ($p > 0,05$) (Figura 11). Na presença da WSMoL (na maior concentração avaliada, 30 μ L; 150 μ g mL⁻¹), a atividade de tripsina no sobrenadante obtido dos nematoides foi aumentada (0,87 mU/mL). No entanto, o efeito também não foi significativo ($p > 0,05$) (Figura 11):

Figura 11: Atividade de tripsina de nematoides gastrintestinais de caprinos na presença da WSMoL. Atividade de tripsina secretada (S) e de tripsina não secretada (E) na ausência ou presença da WSMoL nas concentrações de 75 μ g mL⁻¹ e 150 μ g mL⁻¹, respectivamente ($p > 0,05$).



Fonte: Dados do Autor.

A atividade de tripsina no sobrenadante (proteínas secretadas) e no extrato das larvas (proteínas não secretadas) de NGI de caprinos foi quantificada com o propósito de se verificar sua interferência sobre a ação anti-helmíntica da WSMoL.

Esses resultados dos ensaios enzimáticos corroboram a possível atuação específica da WSMoL sobre o desenvolvimento larval, já que sua provável atuação se concentra em células do epitélio intestinal dos nematoides.

Em larvas de insetos, a WSMoL mostrou efeito interferente na atividade de enzimas digestivas, havendo um aumento da atividade proteolítica, degradando proteínas de importância biológica e morfológica (COELHO et al., 2009). Tal interferência funcional foi associada à morte das larvas de *A. aegypti* (AGRA-NETO et al., 2014).

Bijina e colaboradores (2011) observaram que as sementes de *M. oleifera* são fontes de inibidores de proteases, especialmente do tipo tripsina (EC 3.4.21.4) e quimotripsina (EC 3.4.21.1), sendo essa atividade inibidora associada à presença de proteínas nas sementes. Nesse estudo, também foi observada uma diminuição moderada da atividade de tripsina não secretada de NGI na presença da WSMoL (Figura 11), mesmo o resultado não sendo considerado significativo, do ponto de vista estatístico.

Investigação da Localização da WSMoL Conjugada a FITC sobre Ovos e Larvas

As imagens obtidas por microscopia de fluorescência de NGI de

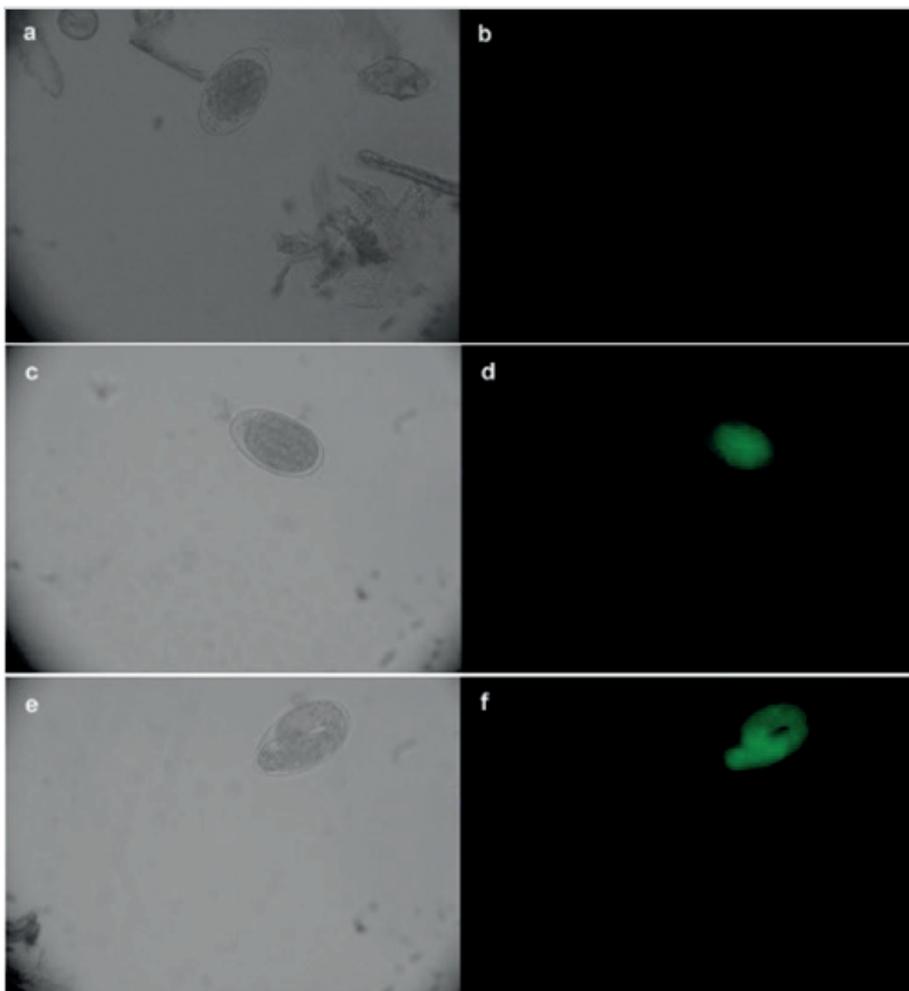
caprinos, nas fases de ovo e de larva, tratados com 1 mg mL⁻¹ de WSMoL conjugada a FITC (durante 1 h de incubação), estão apresentadas nas figuras 12 e 13, respectivamente.

Houve claramente a marcação fluorescente do conteúdo embrionário do ovo tratado com a WSMoL conjugada a FITC (Figura 12d). Houve também marcação fluorescente de nematoide em estágio final de desenvolvimento embrionário para gerar L1, a qual está em período de pré-eclosão do ovo (Figura 12f). Os resultados obtidos nesse ensaio biológico revelaram que a WSMoL conjugada a FITC possui afinidade por estruturas moleculares constituintes do material embrionário presente no ovo.

Os nematoides em fase de larva, tratados com a WSMoL conjugada a FITC, apresentaram marcação fluorescente em toda a massa corporal da larva (Figura 13d). Houve marcação de fragmentos de não interesse, devido à presença de artefatos⁴ e vestígios de WSMoL-FITC, após a lavagem com PBS (realizada para a retirada do excesso do complexo WSMoL-FITC) (Figura 13d). Houve também a marcação fluorescente de larva em processo de eclosão do ovo, apresentando todo o conteúdo corporal marcado por WSMoL-FITC (Figura 13f). Os resultados obtidos revelaram que a WSMoL também apresenta afinidade por estruturas moleculares presentes ao longo da estrutura corporal da larva, possivelmente resíduos de carboidratos presentes em glicoconjugados.

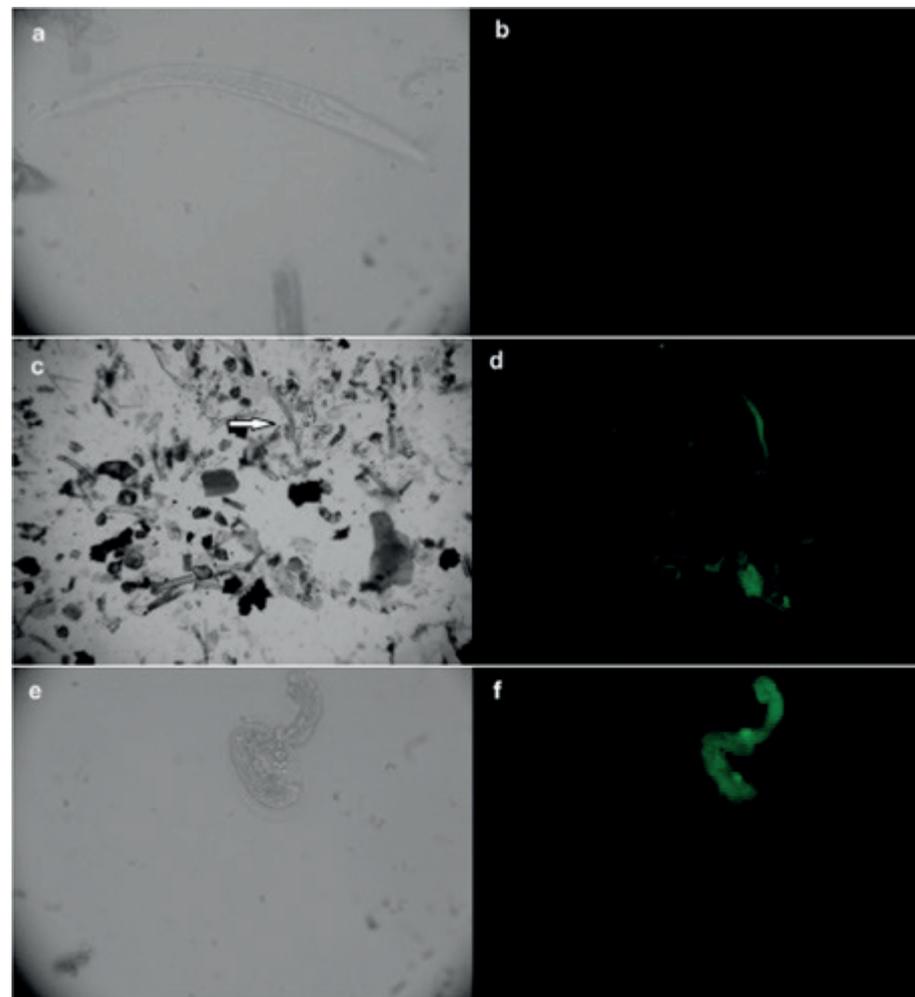
4. Artefatos: material biológico ou não pertencente a peça analisada durante um experimento, não possuindo interesse significativo para o objetivo do experimento.

Figura 12: Microscopia de fluorescência de nematoides gastrintestinais de caprinos na fase de ovo, incubados por 1 h com WSMoL (1 mg mL⁻¹) conjugada a FITC (aumento de 40x). (a) e (b): controle negativo; (c) e (d): material embrionário marcado com WSMoL conjugada a FITC; (e) e (f): nematoide em estágio final de desenvolvimento embrionário para gerar L1, antes da eclosão do ovo, marcado com WSMoL conjugada a FITC.



Fonte: Dados do Autor.

Figura 13: Microscopia de fluorescência de nematoides gastrintestinais de caprinos na fase de larva, incubados por 1 h com WSMoL (1 mg mL⁻¹) conjugada a FITC (aumento de 40x e 10x). (a) e (b): controle negativo; (c) e (d): larva marcada com WSMoL conjugada a FITC; (e) e (f): larva eclodindo do ovo, marcada com WSMoL conjugada a FITC.



Fonte: Dados do Autor.

Sensores químicos presentes em nematoides estão envolvidos funcionalmente a um fator promotor, no processo de infecção, já no hospedeiro (essa capacidade promotora é estabelecida em função do estado de equilíbrio do nematoide relacionado ao seu habitat no hospedeiro, em que precisa reconhecer condições químicas no ambiente para garantir a sua sobrevivência). Estudos realizados com as espécies de *Caenorhabditis elegans*, *Panagrellus redivivus* e *Strongyloides ratti* evidenciaram que, quando esses nematoides são tratados com enzimas ou glicoproteínas/lectinas (Con A, WGA e SBA), ocorre uma dissociação/desequilíbrio funcional de receptores químicos envolvidos nesse processo de estabilização da infecção. Há, portanto, uma perda quase completa da função desses receptores, com consequente ausência de infecção pelos nematoides. Essa ação/resposta quimiocinética é avaliada, principalmente, pela motilidade, bem como pelos aspectos morfológicos do nematoide, utilizando diferentes técnicas de microscopia (ZUCKERMAN & JANSSON, 1984; TOBATA-KUDO et al., 2005).

No caso das lectinas, que se ligam de forma específica a carboidratos, quando em contato com nematoides, promovem um bloqueio de açúcares terminais presentes na cutícula desses últimos, bem como em receptores de membrana, na porção labial e em regiões neuronais (do tipo amphids - estudo ainda pouco elucidado). Essa ação impossibilita o processo infectante, já no hospedeiro, promovido pelas larvas em estágio L3, podendo haver uma desordem funcional no nematoide com consequente confusão motora (ZUCKERMAN & JANSSON, 1984; TOBATA-KUDO et al., 2005). Tal mecanismo explica uma possível parada no desenvolvimento das larvas, principalmente para o estágio infectante, ou seja, o L3; o mecanismo também valida a presença de carboidratos na constituição desses receptores, os quais têm papel importante para a ação lectínica.

Heim e colaboradores (2015) verificaram, através de marcação fluorescente, que lectinas isoladas de fungos (MOA, AAL, CGL2 E CCL2) apresentaram afinidade a células da microvilosidade intestinal em nematoides da espécie *H. contortus*. Essa afinidade foi adquirida pela provável presença de glicanos, de formas moleculares específicas a ligação das lectinas testadas, em células do trato intestinal do nematoide, sendo essas moléculas caracterizadas como epítomos com glicanos.

Apesar da falta de relatos sobre a existência desses epítomos em *H. contortus*, acredita-se que a espécie *Caenorhabditis elegans* traz características genéticas e morfológicas semelhantes ao *H. contortus*, servindo como modelo experimental para tais estudos (HEIM et al., 2015).

Outro fator de relevância quanto à relação da lectina com os nematoides é a genética; expressão gênica. O processo de desenvolvimento dos nematoides até a fase adulta baseia-se diretamente na regulação e expressão de mais de 11 mil genes, os quais estão envolvidos em diferentes formas de estratégia de sobrevivência, no processo de infecção do hospedeiro. A princípio, essa expressão de genes está associada à síntese de proteínas com ação proteolítica, ao metabolismo de carboidratos, à formação da cutícula, a neurotransmissores e à secreção de proteínas (LAING et al., 2013; SCHWARZ et al., 2013).

Na transição do ovo para o estágio larval L1, há a expressão de mais genes envolvidos com o desenvolvimento muscular e motilidade, desenvolvimento embrionário, replicação do DNA e organização cromossômica. Já na transição do estágio larval L1 para o L3, há incremento gênico relacionado ao metabolismo de carboidratos e à formação do complexo miosina e atividade motora (LAING et al., 2013; SCHWARZ et al., 2013). A WSMoL pode vir a interferir nessas mudanças de expressão gênica, contribuindo para o efeito anti-helmíntico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS



A bioprospecção de produtos naturais continua exercendo um papel fundamental na descoberta de compostos químicos de interesse biotecnológico. O arsenal desses compostos é uma realidade refletida pela grande contribuição das pesquisas básicas e aplicadas desenvolvidas pelas instituições de ensino superior do País.

As lectinas de origem vegetal são um grande exemplo de proteínas biologicamente ativas que são estudadas extensamente com uma diversidade de aplicações. A lectina solúvel em água isolada das sementes de *Moringa oleifera*, denominada de WSMoL, apresentou efeito nematocida significativo nos ensaios realizados neste estudo.

A eclosão dos ovos foi interrompida provavelmente pela associação da lectina aos componentes embrionários e às enzimas envolvidas no processo de eclosão. A composição dos ovos (com a presença de quitina) pode ter refletido nesse efeito, uma vez que a lectina utilizada no estudo apresenta afinidade ao polímero de N-acetil-glicosamina.

A lectina também interferiu no desenvolvimento das larvas do estágio L1 para o L3, havendo afinidade da lectina pelo conteúdo corporal das larvas, provavelmente por interagir com os componentes da cutícula do nematoide (rica em colágeno e glicoproteínas).

Os dados apresentados indicam a importância da continuidade dos estudos envolvendo lectinas com efeitos nocivos aos nematoides que acometem pequenos ruminantes. Sabe-se que mundialmente há a crescente triagem de compostos naturais com efeito anti-helmíntico, e que o objetivo de alcançar alternativas viáveis ao uso de químicos sintéticos como anti-helmínticos deve ser mantido.

REFERÊNCIAS



ABREU, M.P.; GARCÍA, J.A.; LEYVA, Y.L. et al. Efecto *in vitro* de extractos acuosos de *Moringa oleifera* y *Gliricida sepium* em el desarrollo de las fases exógenas de estrongídeos gastrointestinales de ovinos. *Rev. Salud. Anim.* v. 36, 28-34, 2014.

AFONSO-CARDOSO, S.R.; SILVA, C.V.; FERREIRA, M.S. et al. Effect of the *Synadenium carinatum* látex lectin (ScLL) on *Leshmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection in murine macrophage. *Experimental Parasitol.* v. 128, 61-67, 2011.

AGAPOV, I.I.; TONEVITSKY, A.G.; MALUCHENKO, N.V. et al. Mistletoe lectin A-chain unfolds during the intracellular transport. *FEBS Letters.* v. 464, 63-66, 1999.

AGRA-NETO, A.C.; NAPOLEÃO, T.H.; PONTUAL, E.V. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. *Parasitol. Res.* v. 113, 2013.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B. et al. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Clico- Celular não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução. *Quím. Nova.* v. 28, 118-129, 2005.

AL-ANIZI, A.A.; HELLYER, M.T.; ZHANG, D. Toxicity assessment and modelling of *Moringa oleifera* seeds in water purification by whole cell bioreporter. *Water Research.* v. 56, 77-87, 2014.

ALVES, M.SM. Caracterização farmacognóstica, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B Verlt. f. 114. Dissertação de Mestrado. Universi-

dade Federal do Pará-UFGA. Belém-PA, 2008.

ANDRADE, C.A.S. Atividade antitumoral de lectina de *Cratylia mollis* encapsulada em lipossomas. f. 61. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. Recife-PE, 2003.

ARAÚJO, L.C.C.; AGUIAR, J.S.; NAPOLEÃO, T.H. et al. Evaluation of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Lectins from *Moringa oleifera* Seeds. *PLoS ONE*. v. 8, 2013.

ASADUZZAMAN, A.K.M.; HASAN, I.; CHAKRABORTTY, A. et al. *Moringa oleifera* seed lectin inhibits Ehrlich ascites carcinoma cell growth by inducing apoptosis through the regulation of Bak and NF- κ B gene expression. *Int. J. Biol. Macromol.* v. 107, 1936-1944, 2018.

AZEEZ, A.; SANE, A.P.; BHATNAGAR, D. et al. Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. *Phytochemistry*. v. 68, 1352–1357, 2007.

BARBOSA, P.P.S. Purificação, caracterização e atividade biológica de lectinas do extrato de sementes de *Canavalia brasiliensis* (feijão-bravo-do-ceará). f. 73. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba – UFPB. João Pessoa – PB, 2013.

BATISTA, F.A.H. Isolamento e caracterização da lectina camptosemina extraída das sementes de *Camptosema ellipticum*. f. 71. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. São Carlos, São Paulo-SP, 2007.

BATISTA, J.F.; CAMPELO, J.E.G.; MORAIS, M.F. et al. Gastrointestinal parasitism in *Anglo-Nubiangoats*. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* v.15, 318-326, 2014.

BATATINHA, M.J.M.; ALMEIDA, G.N.; DOMINGUES, L.F. et al.

Efeitos dos Extratos Aquoso e Metanólico de Algaroba sobre Culturas de Larvas de Nematoides Gastrointestinais de Caprinos. *Cienc. Anim. Bras.* v.12, 514-519, 2011.

BAKER, R.L.; NAGDA, S.; RODRIGUEZ-ZAS, S.L. et al. Resistance and resilience to gastro-intestinal nematode parasites and relationships with productivity of Red Maasai, Dorper and Red Maasai X Dorper crossbred lambs in the sub-humid tropics. *Animal Sci.* v.76, 119-136, 2003.

BEN SALEM, H.; MAKKAR, H.P.S. Defatted *Moringa oleifera* seed meal as a feed additive for sheep. *Anim Feed Sci Tech.* v. 150, 27-33, 2009.

BEZERRA, D.K.F. Efeito anti-inflamatório da lectina isolada de sementes de *Bauhinia bauhinioides* MART. f. 104. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Ceará-UECE. Fortaleza-CE, 2012.

BEZERRA, A.C.D.S. Caracterização da resistência a anti-helmínticos e análise molecular de populações de *Haemonchus contortus* frente aos benzimidazóis no município de Mossoró-RN. f. 92. Tese Doutorado, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFRSA, Mossoró-RN, 2014.

BIJINA, B.; CHELLAPPAN, S.; KRISHNA, J.G. et al. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* with potential for use as therapeutic drug and as seafood preservative. *Saudi J. Biological Sci.* v.18, 273–281, 2011.

BITENCOURT, F.S. Estudo da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da lectina isolada da alga marinha vermelha *Hypnea cervicornis* (J. Agardh). Dissertação de Mestrado. f. 140. Universidade Federal do Ceará-UFC. Fortaleza-CE, 2007.

BIZIMENYRA, E.S.; GITHIORI, J.B.; ELOFF, J.N. et al. *In vitro* ac-

tivity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* v. 142, 336-343, 2006.

BOU, D.D.; TEMPONE, A.G.; PINTO, E.G. et al. Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on Leishmania and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. *Phytomedicine.* v. 21, 676-681, 2014.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Sci.* v. 119, 1954.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* v.72, 248-254, 1976.

BROWN, H.D.; MATZUK, A.R.; ILVES, I.R. et al. Antiparasitic drugs-IV. 2-(40-Thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. *J. American Chem. Society.* v. 83, 1764-1765, 1961.

CARVALHO, C.O.; CHAGAS, A.C.S.; COTINGUIBA, F. et al. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Vet. Parasitol.* v. 183, 260-268, 2012.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S. et al. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the diocleinae subtribe lectins. *Current Protein & Peptide Sci.* v. 2, 123-135, 2001.

CASTANHEIRA, L.E.; NUNES, D.C.; CARDOSO, T.M. et al. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Int. J. Biol. Macromol.* v. 54, 57-64, 2013.

CEZAR, A.S.; CATTO, J.B.; BIANCHIN, I. Alternative control of the gastrointestinal nematodes of the ruminants: actuality and perspectives. *Ciê. Rural.* v.38, 2008.

CHAGAS, A.C.; NICIURA, S.C.M.; MOLENTO, M.B. Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. Editores técnicos: CHAGAS, A.C.; NICIURA, S.C.M.; MOLENTO, M.B. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 153 p. 2011.

CHARTIER, C.; PORS, I. Effect of the nematophagous fungus, *Duddingtonia flagrans*, on the larval development of goat parasitic nematodes: a plot study. *Vet. Res.* v.34, 221-230, 2003.

CHEHRESA, A. Benzimidazole-resistance and associated changes in life history traits of *helzigimosa2cfoides pol ygyrus* (niehlatoda) n mce. f. 205. Tese de Doutorado, Institute of Parasitology, McGill University. Montreal, Quebec, Canada, July, 1996.

CHUMARK, P.; KHUNAWAT, P.; SANVARINDA, Y. et al. The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *J. Ethnopharmacol.* v. 116, 439-446, 2008.

CHUANG, P.H.; LEE, C.W.; CHOU, J.Y. et al. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresour Technol.* v. 98, 232-236, 2007.

CRAIG, H.; ELWYN-ISAAC, R.; BROOKS, D.R. Unravelling the moultingdegradome: new opportunities for chemotherapy? *Trends in Parasitol.* v. 23, 248-253, 2007.

COELHO, J.S.; SANTOS, N.D.L.; NAPOLEÃO, T.H. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere.* v. 77, 934-938, 2009.

COLES, G.C.; JACKSON, F.; POMROY, W.E. et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* v. 136, 167-185, 2006.

CORIOLOANO, M.C.; MELO, C.M.; SILVA, F.D.E.O. et al. Parkia pendula seed lectin: potential use to treat cutaneous wounds in healthy and immunocompromised mice. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 172, 2682-93, 2014.

COSTA, V.M.M.; SIMÕES, S.V.D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* v. 31, 65-71, 2011.

COTA, G.F.; DE SOUSA, M.R.; DE MEDONÇA, A.L.P. et al. Leishmania-HIV co-infection: Clinical presentation and outcomes in na urban are in Brazil. *PloS Negl. Trop. Dis.* v. 8, 2014.

DIAGNOSIS OF VETERINARY ENDOPARASITIC INFECTIONS. *Haemonchus contortus* Life Cycle. Disponível em: <http://research.vet.upenn.edu/ParasiteLifeCycles/HaemonchuscontortusLifeCycle/tabid/7979/Default.aspx>. Acesso em 20/02/2016.

DIAS, A.S.F. Lectina da esponja marinha *Tedania ignis*: purificação, caracterização e interação com Leishmanias. f. 68. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN. Natal-RN, 2006.

DRESCH, R.R.; HAESER, A.S.; LERNER, C. et al. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. *Brazilian J. Pharmacognosy.* v. 15, 16-22, 2005.

EL-AASSAR, M.R.; HAFEZ, E.E.; EL-DEEB, N.M. et al. Microencapsulation of lectin anti-cancer agent and controlled release by al-

ginate beads, biosafety approach. *Int. J. Biol. Macromol.* v. 69, 88-94, 2014.

FARIAS, D.F.; CAVALHEIRO, M.G.; VIANA, M.P. et al. Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* L. *An. Academia Brasileira de Ciê.* v. 82, 585-594, 2010.

FAHEY, J.W. *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. *Trees for Life J.* v.1, 2005.

FERREIRA, P.P.; CARVALHO, A.F.U.; FARIAS, D. et al. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. *An. Academia Brasileira de Ciê.* v. 81, 207-216, 2009.

FERREIRA, R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, A.F. et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. *Lett. Appl. Microbiol.* v. 53, 186-192, 2011.

FORTES, F.S.; PONDELEK, D.A.S.; BIER, D. Nematoides gastrintestinais. In. Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. Editores técnicos: CHAGAS, A.C; NICIURA, S.C.M; MOLENTO, M.B. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 153 p. 2011.

FOREST, S.; KIM STARR. *Moringa oleifera* (Kalamungay, drumstick tree) Seedpods at Kahului, Maui, Hawaii. February 07, 2007, Hawaii, USA. www.starrenvironmental.com fstarr@hawaii.rr.com. <https://www.flickr.com/photos/starr-environmental/23184371252/> Acesso em 20 de Outubro de 2014.

FU, L.; ZHOU, C.; YAO, S. et al. Plant lectin: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* v. 43, 1442-1449, 2011.

GALUPPO, M.; GIACOPPO, S.; NICOLA, G.R. et al. Antiinflammatory activity of glucomoringin isothiocyanate in a mouse 2 model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Fitoterapia.* v. 95, 160-174, 2014.

GARCÍA-GASCA, T.; GARCÍA-CRUZ, M.; HERNANDEZ-RIVERA, E. et al. Effects of Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Protease Inhibitor and Semipure Lectin Fractions on Cancer Cells. *Nutrition and Cancer.* v. 64, 1269–1278, 2012.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K.D.; TAUSCHER, B. et al. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1243, 477–481, 1995.

GITHIORI, J.B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet. Parasitol.* v. 139, 308–320, 2006.

GOTO, L.S. Estudos estruturais e funcionais sobre duas lectinas: cadeia B recombinante da Pulchellina & Camptosemina. f. 163. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo-USP. São Paulo-SP, 2007.

GOVINDARAJAN, M.; KARUPPANNAN, P. Mosquito larvicidal and ovicidal properties of *Eclipta alba* (L.) Hassk (Asteraceae) against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific J. Trop. Med.* v. 4, 24–28, 2011.

GUEVARA, A.P.; VARGAS, C.; SAKURAI, H. et al. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutation Res.* v. 440, 181–188, 1999.

HAGE, D.S. High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding. *J. Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sci.* v. 768, 3-30, 2002.

HEIM, C.; HERTZBERG, H.; BUTSCHI, A. et al. Inhibition of *Haemonchus contortus* larval development by fungal lectins. *Parasit. Vectors.* v. 8, 2015.

HOLSBACK, L.; PORTO, P.P.; MÁRQUEZ, E.S. et al. Phyto-biotherapy to control gastrointestinal nematodes of sheep. *Semina: Ciê. Agrárias.* v. 34, 3841-3850, 2013.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S. et al. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *TRENDS in Parasitol.* v. 22, 2006

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J.F.J. Non chemical control of helminthes in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. *Vet. Parasitol.* v. 180, 144–154, 2011.

HOSTE, H.; MARTÍNEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C.; MANOLARAKI, F. et al. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Vet. Parasitol.* v. 186, 18-27, 2012.

HOUNZANGBE-ADOTE, M.S.; PAOLINI, V.; FOURASTE, I. et al. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* v. 78, 155-160, 2005.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Records.* v. 130, 442-446, 1992.

KARANU, F.N.; RURANGIRWA, D.P.; MCGUIRE, T.C. et al. *Hae-*

monchus contortus: inter- and intrageographic isolate heterogeneity of proteases in adult worm excretory–secretory products. *Experimental Parasitol.* v. 86, 89-91, 1997

KARANU, F.N.; RURANGIRWA, F.R.; MCGUIRE, T.C. et al. *Haemonchus contortus*: Identification of proteases with diverse characteristics in adult worm excretory/secretory products. *Experimental Parasitol.* v. 77, 362-371, 1993.

KATRE, U.V.; SURESH, C.G.; KHAN, I. et al. Structure-activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. *Int. J. Biol. Molecules.* v. 42, 203-207, 2008.

KAKADE, M.L.; SIMONS, N.; LIENER, I.E. An evaluation of natural versus synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybeans samples. *Cereal Chem.* v. 46, 518–526, 1969.

KOBAYASHI, Y.; KAWAGISHI, H. Fungal lectins: a growing family. *Methods Mol. Biol.* v. 1200, 15-38, 2014.

LAING, S.T.; IVENS, A.; LAING, R. et al.. Characterization of the xenobiotic response of *Caenorhabditis elegans* to the anthelmintic drug albendazole and the identification of novel drug glucoside metabolites. *Biochem. J.* v. 432, 505-514, 2010.

LAING, R.; KIKUCHI, T.; MARTINELLI, A. et al. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology.* v. 14, 2013.

LEÓN, S.G.; ARMAS, D.C.; CHÁVEZ, A.G. Lectin: a biomolecule that promises in biomedical sciences. *Rev. Cienc. Médicas.* v. 15, 3-12, 2011.

LECOEUR, H. Nuclear Apoptosis Detection by Flow Cytometry:

Influence of Endogenous Endonucleases. *Exp. Cell Res.* v. 277, 1-14, 2002.

LIMPIAS, C.; PÉREZ, G.; ACOSTA, J. et al. Detección del antígeno tn en tumores epiteliales con la lectina de *Vicia villosa* isolectina B4. *Rev. Fac. Med.* v. 58, 2010.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; SILVA, M.B.R. et al. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus*, and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comp. Biochem. Physiol. A.* v. 146, 486-498, 2007.

MANSFIELD, L.S.; GAMBLE, H.R.; FETTERER, R.H. Characterization of the eggshell of *Haemonchus Contortus*—I. Structural components. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 103, 681-686, 1992.

MARANGONI, V.S. Estudo e desenvolvimento de compósitos contendo nanopartículas de ouro conjugadas com biomoléculas: síntese e aplicações em nanomedicina. f. 116. Dissertação de Mestrado. Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo-USP, São Paulo-SP, 2012.

MARTIN, R.J. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet. J.* v. 154, 11-34, 1997.

MARTÍN, C.; MARTÍN, G.; GARCÍA, A. et al. Potential applications of *Moringa oleifera*. A critical review. *Pastos y Forrajes.* v. 36, 137-149, 2013.

MARTINS, G.V.F. Avaliação do potencial citotóxico das lectinas de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba-UFPB. João Pessoa-PB, 2009.

MEDEIROS, M.L.S. Atividade citotóxica de extrato extracelular de bactéria halotolerante do gênero *Bacillus sp.* sobre linhagens celulares renais. f. 47. Monografia. Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFRSA. Mossoró-RN, 2013.

MELO, A.C.F.L.; BEVILAQUA, C.M.L. Resistência anti-helmíntica em nematóides de pequenos ruminantes: uma revisão. *Ciê. Animal.* v. 12, 35-45, 2002.

MELO, A.C.F.L.; BEVILAQUA, C.M.L. Genetic approach of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*. *Rev. P. Ciênc. Vet.* v. 100, 141-146, 2005.

MESA, M.D.; MOJICA, E.; MERCA, F. Purification of lectin from mature seeds of malunggay (*Moringa pterygosperma*). *Philippine Journal of Crop Science.* v. 29, 13-24, 2004.

MITCHELL, S.W. Researches upon the venom of the rattlesnake. *Smithsonian Contrib Knowledge XII:* 89-90, 1860.

MONTE, L.G.; SANTI-GADELHA, T.; REIS, L.B. et al. Lectin of *Abelmoschus esculentus* (okra) promotes selective antitumor effects in human breast cancer cells. *Biotechnol. Lett.* v. 36, 2013.

MOLAN, A.L.; WAGHORN, G.C.; MCNABB, W.C. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* in vitro. *Vet. Rec.* v. 150, 65-69, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *JIM.* v. 65, 55-63, 1983.

MOURA, G.E.D.D. Avaliação do efeito citotóxico da lectina da esponja marinha *Cliona varians* contra células de leucemia mielóide crônica. f. 89. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio

Grande do Norte-UFRN. Natal-RN, 2007.

MOURA, K.S.; SILVA, H.R.C.; DORNELLES, L.P. et al. Coagulant Activity of Water-Soluble *Moringa oleifera* Lectin Is Linked to Lowering of Electrical Resistance and Inhibited by Monosaccharides and Magnesium Ions. *Appl Biochem Biotechnol.* v. 180, 1361-1371, 2016.

MULEKE, C.I.; RUOFENG, Y.; LIXIN, X. et al. Characterization of HC58cDNA, a putative cysteine protease from the parasite *Haemonchus contortus*. *J. Vet. Sci.* v. 7, 249-255, 2006.

NANDHINI, A.; SUMATHI, C. Review: An Overview of Herbals used in Helminthiasis. *World J. Pharmaceutical Res.* v.3, 2014.

NERY, P.S.; DUARTE, E.R.; MARTINS, E.R. Eficácia de plantas para o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. *Rev. Bras. Pl. Med.* v. 11, 330-338, 2009.

NERY, P.S.; NOGUEIRA, F.A.; MARTINS, E.R. et al. Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. *Vet. Parasitol.* v. 171, 361-364, 2010.

NICIURA, S.C.M.; VERÍSSIMO, C.J.; MOLENTO, M.B. Determinação da Eficácia Antihelmíntica em Rebanhos Ovinos: Metodologia da Colheita de Amostras e de Informações de Manejo Zossanitário. São Paulo: EMBRAPA Pecuária Sudeste, 27p, 2009. (EMBRAPA Documento 91).

ODA, Y.; MINAMI, K.; ICHIDA, S. et al. A new agglutinin from the *Tulipa gesneriana* bulbs. *Eur. J. Biochem.* v. 165, 297-302, 1987.

OLIVEIRA, J.T.A.; SILVEIRA, S.B.; VASCONCELOS, K.M. et al. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. *J. Sci. Food Agric.* v. 79, 815-820, 1999.

OLIVEIRA, C.F.R.; LUZ, L.A.; PAIVA, P.M.G. et al. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera lectin* (cMol) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. *Process Biochem.* V. 46, 498-504, 2011.

PAIM, L.B. Ação antiinflamatória da lectina de semente *Dioclea violacea* na artrite induzida por zymosan. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará-UFC. Fortaleza-CE, 2006.

PANDA, P.K.; MUKHOPADHYAY, S.; BEHERA, B. et al. Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway. *Life Sci.* v. 11, 27-35, 2014.

PEDROSO, M.M. Estudo da interação lectina-carboidrato por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo. f. 91. Dissertação de Mestrado. Univesrsidade Federal de São Carlos-UFSCar. São Carlos-SP, 2006.

PEREIRA, S.F. Caracterização dos efeitos biológicos das lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) E DE *Canavalia ensiformes* (ConA) em preparações do sistema nervoso central e em células tumorais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Santa Maria-RS, 2005.

PEREIRA, C.S. Avaliação da presença de resistencia antihelmintica em um rebanho de ovino I no municipio de Porto Velho. f. 60. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2011.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as Plant Defense Proteins. *Plant Physiol.* v. 109, 347-352, 1995.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant Lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* v. 15, 1998.

PINTO, V.P.T. Utilização de lectinas na identificação de receptores de glicídios de células neoplásicas. f. 110. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará-UFC. Fortaleza-CE, 2001.

PIRES, A.F. Atividade antinociceptiva de uma lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* MART. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Ceará-UECE. Fortaleza-CE, 2007.

PONTUAL, E.V.; SANTOS, N.D.L.; MOURA, M.C. et al. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. *Parasitol. Res.* v. 113, 727-733, 2014.

POVINELI, K.L.; FINARDI FILHO, F. The multiple functions of plant lectins. *Nutrire; Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.* v.24, 135-156, 2002.

PUJARI, R.; ELIGAR, S.M.; KUMAR, N. et al. Rhizoctonia Bataticola Lectin (RBL) Induces Caspase-8-Mediated Apoptosis in Human T-Cell Leukemia Cell Lines but Not in Normal CD3 and CD34 Positive Cells. *PLoS ONE.* v. 8, 2013.

QUEIROZ, A.F.S. Efeito pró-inflamatório de uma lectina purificada da esponja marinha *Cliona varians*. f. 47. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN. Natal-RN, 2008.

RABELO, L.; MONTEIRO, N.; SERQUIZ, R. et al. A Lactose-Binding Lectin from the Marine Sponge *Cinachyrella apion* (Cal) Induces Cell Death in Human Cervical Adenocarcinoma Cells. *Mar. Drugs.* v. 10, 727-743, 2012.

RAMOS, D.B.M.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H. et al. Antimicrobial Activity of Cladonia verticillaris Lichen Preparations on Bacteria and Fungi of Medical Importance. *Chin. J. Biol.* v. 2014, 2014.

REGO, E.J.L.; CARVALHO, D.D.; MARANGONI, S. et al. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (Smooth rattlebox). *Phytochemistry*. v. 60, 441-446, 2002.

RÍOS-DE ÁLVAREZ, L. Mechanisms of action of plant secondary metabolites and their effect on the immune response of parasitised sheep. f. 198. Tese de Doutorado (Doctor of Philosophy), University of Edinburgh, Escócia, 2009.

RÍOS-DE ÁLVAREZ, L.; JACKSON, F.; GREER, A. et al. *In vitro* screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Vet. Parasitol.* v. 186, 390-398, 2012a.

RÍOS-DE ÁLVAREZ, L.; JACKSON, F.; GREER, A. et al. Direct anthelmintic and immunostimulatory effects of oral dosing semi-purified phytohaemagglutinin lectin in sheep infected with *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* v. 187, 267-274, 2012b.

ROCHA, D.D. Estudo das atividades citotóxica e antitumoral de vitaisilinas isoladas de *Acnistus arborescens*. f. 123. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2008.

ROEBER, F.; JEX, A.A.; GASSER, R.B. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasites & Vectors*. v. 6, n. 153, 2-13, 2013.

RUIZ, A.; MOLINA, J.M.; NJUE, A. et al. Genetic variability in cysteine protease genes of *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* v. 128, 549-559, 2004.

SAGRILO, E.; GIRÃO, E.S.; BARBOSA, F.J.V. et al. Agricultura Familiar: manejo sanitário. EMBRAPA Meio-Norte, Sistema de Produção 1, versão eletrônica, ISSN 1678-8818, Jan, 2003. Disponível em:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/AgriculturaFamiliar/RegiaoMeioNorteBrasil/Caprilos/manejosanitario.htm>.

SALLES, H.O.; BRAGA, A.C.L.; NASCIMENTO, M.T.S.C. et al. Lectina, hemolisina e inibidores de protease em frações de sementes com atividade ovicida contra *Haemonchus contortus*. *Braz. J. Vet. Parasitol.* v. 23, 136-143, 2014.

SANTOS, A.F.S.; ARGOLLO, A.C.C.; COELHO, L.C.B.B. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidante componente from *Moringa oleifera* seeds. *Water Res.* v. 39, 975-980, 2005.

SANTOS, A.F.S.; LUZ, L.A.; ARGOLLO, A.C.C. et al. Isolation of a seed coagulante *Moringa oleifera* lectin. *Process Biochem.* v. 44, 504-508, 2009.

SANTOS, N.D.L.; DE MOURA, K.S.; NAPOLEÃO, T.H. et al. Oviposition-Stimulant and Ovicidal Activities of *Moringa oleifera* Lectin on *Aedes aegypti*. *PLoS ONE*. v. 7, 2012.

SANTOS, F.C.C.; VOGEL, F.S.F.; MONTEIRO, S.G. Efficacy of garlic extract (*Allium sativum*) as an anthelmintic in sheeps. *Rev. Bras. de Agroecologia*. v. 7, 139-144, 2012.

SANTOS, J.M.L. Polimorfismos responsáveis pela resistência a benzimidazóis em populações de *Haemonchus contortus* isoladas no estado do Ceará. f. 62. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Ceará-UECE, Fortaleza-CE, 2013.

SANTOS, A.F.S.; LUZ, L.A.; PONTUAL, E.V. et al. *Moringa oleifera*: Resource Management and Multiuse Life Tree. *Advances in Res.* v. 4, 388-402, 2015.

SANTANA, G.M.S. Purificação e caracterização da lectina de cladônias de *Opuntia ficus indica*. f. 43. Dissertação de Mestrado, Universi-

dade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife-PE, 2008.

SANTIAGO, M.Q.; LEITÃO, C.C.; PEREIRA, F.N.JR. et al. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. *J. Mol. Recognit.* v. 27, 117-23, 2014.

SCHWARZ, E.M.; KORHONEN, P.K.; CAMPBELL, B.E. et al. The genome and developmental transcriptome of the strongyloid nematode *Haemonchus contortus*. *Genome Biol.* v. 14, 2013.

SILVA, M.C.; CORRÊA, A.D.; SANTOS, C.D. et al. Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v. 30, 103-107, 2010.

SINGH, R.S.; JAIN, P.; KAUR, H.P. Characterization and antimicrobial activity of lectins from *Penicillium sp.* *Indian J. Exp. Biol.* v.51 984-991, 2013.

SOUZA, M.A.; AMÂNCIO-PEREIRA, F.; CARDOSO, C.R.B. et al. Isolation and Partial Characterization of a D-Galactose- Binding Lectin from the Latex of *Synadenium carinatum*. *Brazilian Archives of Biol. and Technology.* v. 48, 705-716, 2005.

SOUSA, R.G.; FALCÃO, H.S.; BARBOSA FILHO, J.M. et al. Atividade anti-helmíntica de plantas nativas do continente americano: uma revisão. *Rev. Bras. Pl. Med.* v.15, 287-292, 2013.

SOTOMAIOR, C.S.; MORAES, F.R.; SOUZA, F.P. et al. Parasitoses gastrintestinais dos Ovinos e Caprinos: alternativas de controle. Curitiba: Instituto Emater, 36 p., 2009.

SPRENGER, L.K.; AMARAL, C.H.; FILHO, R.V.L. et al. Eficácia do Fosfato de Levamisol em Nematoides Gastrintestinais de Caprinos e

Ovinos. *Archives of Vet. Sci.* v. 18, 29-39, 2013.

STARR, F.; STARR, K. Plants of Hawaii. <http://www.hear.org/starr/hiplants/index.html>, <http://www.biolib.cz/en/image/id54406/> 2007. Acesso em 20 de Outubro de 2014.

STOCKERT, R.J.; MORELL, A.G.; SCHEINBE, I.H. Mammalian hepatic lectin. *Sci.* v. 186, 365-366, 1974.

TATSUTA, T.; HOSONO, M.; SUGAWARA, S. et al. Sialic acid-binding lectin (leczyme) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells. *Int. J. Oncology.* v. 43, 1402-1412, 2013.

_____; TAKAHASHI, K. et al. Sialic acid-binding lectin (leczyme) induces apoptosis to malignant mesothelioma and exerts synergistic antitumor effects with TRAIL. *Int. J. Oncology.* v. 44, 377-384, 2014.

TOBATA-KUDO, H.; KUDO, H.; TADA, I. *Strongyloides ratti*: Chemokinesis of glycolytic enzyme- and lectin-treated third-stage infective larvae *in vitro*. *Parasitol. Int.* v. 54, 147-152, 2005.

TRINDADE, M.B. Purificação, caracterização de estudos estruturais de duas novas lectinas ligantes de quitina das sementes do gênero *Artocarpus*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo-USP. São Paulo-SP, 2005.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A. et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Plant. Sci.* v. 17, 575-692, 1998.

VARGAS-MAGAÑA, J.J.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; AGUILAR-CABELLERO, A.J. et al. Anthelmintic activity of acetone-water

extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Vet. Parasitol.* v. 206, 322-327, 2014.

VIEIRA, L.S. Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos / Luiz da Silva Vieira. - Sobral: Embrapa Caprinos, 2005. 32 p.- (Série Documentos / Embrapa Caprinos, ISSN 1676-7659; 58, 2005.

YADAV, J.; SHARMA, S.K; SINGH, L. et al. An Overview on *Moringa oleifera*: A Potential Medicinal Herb. *J. Drug Discovery and Therapeutics.* v. 1, 100-105, 2013.

YASSA, H.D.; TOHAMY, A.F. Extract of *Moringa oleifera* leaves ameliorantes streptozotocin-induced Diabetes mellitus in adults rats. *Acta Histichimica.* v. 116, 844-854, 2014.

WOLSTENHOLME, A.J.; FAIRWEATHER, I.; PRICHARD, R. et al. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitol.* v. 20, 469-476. 2004.

ZANETTI, G.D. Lectina dos rizomas de *Arundo donax* L.: purificação, caracterização, propriedades, imuno-histoquímica e separação das isoformas. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRS. Porto Alegre-RS, 2007.

ZHANG, G.; SUN, J.; WANG, H. et al. First isolation and characterization of a novel lectin potente antitumor activity from a *Russula* mushroom. *Phytomedicine.* v. 17, 775-781, 2010.

ZUCKERMAN, B.M.; JANSSON, H. Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host/prey recognition. *Ann. Rev. Phytopathol.* v. 22, 95-113, 1984.



Pesquisas voltadas para a prospecção de produtos de origem natural são de grande interesse devido à crescente necessidade de se desenvolver novos medicamentos, com maior eficácia e com menos efeitos colaterais, comparados aos fármacos atualmente disponíveis. A despeito da importância do potencial de moléculas bioativas isoladas de vegetais, o uso de modelos experimentais *in vitro* se torna extremamente necessário para elucidar mecanismos envolvidos na atividade biológica exercida, sendo vital para a descoberta de novas moléculas com atividades promissoras contra doenças humanas e de animais. Nessa obra, você encontrará dados e discussões a respeito da ação nematocida de uma proteína, do tipo lectina (denominada WSMoL), purificada de sementes da espécie *Moringa oleifera*, através de ensaios *in vitro* com ovos e larvas recuperadas de pequenos ruminantes naturalmente infectados.

**Mário Luan Silva de Medeiros
Michele Dalvina Correia da Silva**

