

PARTICIPAÇÃO DA VIA NO/K⁺ATP NO EFEITO PROTETOR DE UMA GALACTANA SULFATADA EXTRAÍDA DE *Gracilaria caudata* NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS

Geice Maria Pereira dos Santos (bolsista, ICV), Renan Oliveira Silva (colaborador, UFPI – CMRV), Lucas Antonio Duarte Nicolau (colaborador, UFPI – CMRV), Jand-Venes Rolim Medeiros (Orientador, Depto de Biologia – UFPI – CMRV)

INTRODUÇÃO

A grande diversidade biológica das algas marinhas e sua ocorrência em praticamente todos os ambientes do planeta demonstram a importância desses seres vivos para os ecossistemas, compondo a base das cadeias alimentares dos mares e oceanos (RAVEN et al., 2001). Em anos recentes a indústria farmacêutica tem se voltado para a pesquisa de diversos polímeros extraídos de algas. Apenas nas últimas três décadas, mais de 3.000 novas substâncias foram identificadas a partir de organismos marinhos, demonstrando o grande potencial desse ambiente como fonte de novas classes de moléculas bioativas, dentre elas, aquelas com propriedades antiinflamatória, analgésica e anti-câncer (SCHWARTSMANN et al., 2001).

O etanol é uma causa muito comum de lesão gástrica em humanos. Ele é conhecido como uma substância tóxica que causa injúria à mucosa gástrica. Sua ingestão excessiva pode resultar em gastrite aguda, caracterizada por edema de mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (GUSLANDI, 1987). O etanol causa também depleção do muco protetor, possivelmente por mobilizar os mucopolissacarídeos da mucosa para o lúmen, reduzindo a capacidade secretória de muco do estômago, contribuindo, assim, para a formação de úlceras (ISHIHARA et al., 1988). Dessa forma, derivados de produtos naturais apresentam-se como uma fonte atraente de novas drogas e muitos têm mostrado resultados promissores para a clínica, seja como fonte no desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas ou como um produto adjuvante no tratamento das úlceras gástricas (ARRIETA et al., 2003).

Assim, este projeto visa avaliar a participação da via NO/KATP no efeito protetor de uma galactana sulfatada extraída de *Gracilaria caudata* na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

METODOLOGIA

Camundongos Swiss machos foram inicialmente tratados, por gavagem, com o polissacarídeo testado nas doses de 3, 10, 30 e 90 mg/kg. Após 30 minutos foi administrado etanol 50% (0.5 ml/25g) também por gavagem. O grupo controle recebeu apenas solução salina ou salina + etanol 50%. Uma hora depois, os animais foram sacrificados e os estômagos rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura. As lesões foram medidas utilizando um programa de planimetria computadorizado (software image J[®]) a partir das imagens digitais captadas com um referencial métrico. Amostras de cada estômago foram retiradas e colocadas em formol 10% e após 24 horas foram transferidas para álcool 70% para realização das análises microscópicas. Outras amostras foram para posteriores dosagens de glutathiona (GSH) e malondialdeído (MDA).

Para o estudo do papel do NO, H₂S e dos canais de K⁺ ATP-dependentes, no efeito gastropotetor do polissacarídeo, os animais foram inicialmente, pré-tatados com L-NAME (inibidor não

específico das enzimas NOS) na dose de 10mg/kg i.p., propargilglicina (PAG) na dose de 50mg/kg i.p., ou glibenclamida (droga bloqueadora seletiva dos canais de potássio sensíveis ao ATP) na dose de 10 mg/kg, i.p. Após 30 minutos foi administrado o polissacarídeo (por gavagem) na dose de 30mg/kg. Decorridos 1h após a aplicação do L-NAME, PAG e glibenclamida, foi administrado o etanol 50% (4mg/kg, por gavagem) para induzir a lesão gástrica. Os grupos controles receberam apenas solução salina. Uma hora após a administração do etanol, as lesões gástricas foram determinadas por um programa de planimetria computadorizada (image J). Outro fragmento do estômago foi retirado, pesado e congelado a -80° C para a determinação do nível gástrico de GSH e MDA.

O método de Sedlak, J. & Lindsay, R.H. (1968) foi utilizado para análise de glutatona nas amostras. Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa gástrica dos animais foram homogeneizada em 1 ml de EDTA 0.02 M para cada 100 mg de tecido. Alíquotas de 400 μ L do homogeneizado foi misturadas a 320 μ L de água destilada e a 80 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4° C. A um total de 400 μ L do sobrenadante foi adicionado 800 μ L de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 μ L de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M. A mistura foi agitada por 3 minutos e a absorvância foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em μ g de NP-SH/g de tecido.

Os níveis de malondialdeído na mucosa gástrica foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). Fragmentos da mucosa gástrica (300mg) foram homogeneizados com KCl gelado 1.15% para preparar 10% de homogenato. Meio mililitro (0.5ml) desse homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrífuga de 10 ml, 3ml de H₃PO₄ (1%) e 1 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0.6%) foram acrescentados. Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 4ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 40 segundos com um misturador "vortex", centrifugados a 1200 x g por 10 minutos e a absorvância da camada orgânica foi mensurada em 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em mmol/g de fragmentos umedecidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que o polissacarídeo na dose 30 mg/Kg, possui um efeito gastroprotetor na gastropatia induzida por álcool, diminuindo a extensão da lesão gástrica macroscópica. Comprovamos que o polissacarídeo exerce esse efeito através da via NO/K_{ATP}. Assim, nossos resultados mostram que o efeito do polissacarídeo depende da presença de NO, pois a inibição da produção de NO endógeno reverte o seu efeito gastroprotetor.

Tem sido postulado que os canais de K_{ATP} estão envolvidos em uma variedade de funções fisiopatológicas no estômago tais como: regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade da musculatura gástrica. A capacidade da glibenclamida de alterar a resposta de algumas drogas tem sido aceita como evidência para sugerir o envolvimento dos canais de K_{ATP} nos eventos biológicos (STANDEN et al., 1989). Nossos estudos evidenciaram que a glibenclamida reverteu dose-dependente, o efeito protetor do polissacarídeo sulfatado da alga. Baseados nos

nossos estudos podem inferir que o efeito gastroprotetor do polissacarídeo contra a lesão por etanol é, pelo menos em dependente da ativação dos canais de K_{ATP} .

A determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos na mucosa gástrica dos animais mostrou que a administração de etanol ($124.2 \pm 41.9 \text{ mm}^2$) reduziu significativamente o nível gástrico de glutatona quando comparado ao grupo controle (apenas salina). Entretanto, a administração prévia do polissacarídeo v.o. nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg aumentou os níveis de GSH até valores semelhantes aos normais.

Os animais que receberam etanol 50% ($115.1 \pm 7.4 \text{ mm}^2$) mostraram aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de malondialdeído, quando comparado ao controle que recebeu apenas o veículo, indicando que houve peroxidação lipídica por espécies reativas de oxigênio produzidas pelo etanol. Contudo, quando os animais foram prétratados com o polissacarídeo (30 mg/kg) ($20.0 \pm 11.9 \text{ mm}^2$) observa-se que uma inibição significativa dos níveis gástricos de malondialdeído produzidos pelo etanol.

CONCLUSÃO

- ✓ O polissacarídeo preveniu a lesão gástrica, induzidas pela administração de etanol 50% em camundongos e esse efeito gastroprotetor deve-se em parte da ativação dos canais de K_{ATP} e das vias NO.
- ✓ O polissacarídeo preveniu o consumo de glutatona (GSH) e o aumento da peroxidação lipídica na mucosa gástrica, induzidos pela administração de etanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GUSLANDI, M. Effect of ethanol on the gastric mucosa. **Dig. Dis. Sci**, v. 5, p. 21-32, 1987.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **BIOLOGIA VEGETAL**, 6. ED., RIO DE JANEIRO: ED. GUANABARA KOOGAN, 906P, 2001.
- SCHWARTSMANN, G.; ROCHA, A.; BERLINCK, R.; JIMENO, J. Marine organisms as a sources of new anticancer drugs. *annual oncology*. v. 2, p. 221-225, 2001.
- SCHWARTSMANN, G.; ROCHA, A. B; BERLINCK, R. G.; JIMENO, J. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *The lancet oncology*. 2: 221 – 225, 2001.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with ellman's reagent. *anal biochem.* , v. 25, p. 192-205, 1968.
- STANDEN, N.B.; QUAYULE, J.M.; DAVIES, N.W.; BRAYDEN, J.E.; HUANG, Y.; NELSON, M.T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. *Science*, v. 14, p. 177-180, 1989.

PALAVRAS-CHAVE: *Polissacarídeo, óxido nítrico, etanol.*