

# **EFEITO PROTETOR DE UMA GALACTANA SULFATADA EXTRAÍDA DE *Gracilaria caudata* NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS**

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

## **INTRODUÇÃO**

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<sup>3</sup>. Isto facilita a injúria vascular progressiva dos capilares superficiais e subepiteliais mucosos<sup>5</sup>.

As algas constituem um diversificado grupo de organismos autotróficos que podem ser encontrados em ambientes aquáticos e terrestres úmidos, respondendo assim a inúmeras variáveis ambientais<sup>1</sup>. A síntese de compostos, conhecidos como polissacarídeos sulfatados (PS), tem gerado grande interesse na biotecnologia de produtos naturais, tendo em vista as suas propriedades farmacológicas<sup>2</sup>.

Assim, o objetivo geral deste projeto foi avaliar efeito de um polissacarídeo sulfatado extraído 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 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 retiradas para posteriores dosagens de glutatona (GSH) e malondialdeído (MDA) que são parâmetros importantes na lesão por etanol.

O método de Sedlak, J. & Lindsay, R.H. (1968)<sup>6</sup> foi utilizado para análise de glutatona nas amostras. Para determinação dos níveis gástricos de glutatona, uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa gástrica dos animais foi homogeneizada em 1 ml de EDTA 0.02 M. Alíquotas de 400µL do homogeneizado foram misturadas a 320µL de água destilada e a 80µL de ácido tricloroacético (TCA) 50%. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4º C. A um total de 400µL do sobrenadante foi adicionado 800µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20µL de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em µg de NP-SH/g de tecido.

Os níveis de malondialdeído na mucosa gástrica foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978)<sup>4</sup>. Para os níveis de malondialdeído, fragmentos 300mg da mucosa gástrica foram homogeneizados com KCl gelado 1.15% para preparar 10% de homogenato. Em seguida 0.5ml desse homogenato foi pipetado e processados com uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0.6%). 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 absorbância foi mensurada em 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em mmol/g de fragmentos umedecidos.

Este modelo, descrito por Vissler et al., (1954), permite estudar o efeito de drogas na secreção gástrica<sup>9</sup>. O conteúdo gástrico foi acumulado durante 4 horas e avaliado em termos de volume secretado, pH e acidez total. Os camundongos foram tratados com PLS (30 mg/kg, i.p). Os grupos controle foram tratados com salina, histamina (5 mg kg<sup>-1</sup>) ou ranitidina (5 mg kg<sup>-1</sup>) também por via intraperitoneal. Transcorridas 4 horas da cirurgia, os animais foram sacrificados sob anestesia etérea profunda, os estômagos foram removidos e o conteúdo gástrico foi coletado. O volume final e o pH foram determinados após a lavagem da mucosa com 2 mL de água destilada. A acidez total do suco gástrico foi determinado através de titulação, usando fenolftaleína 2% como indicador.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais tratados apenas com solução salina não apresentaram lesões na mucosa gástrica. Entretanto os animais tratados com etanol 50% apresentaram graves lesões hemorrágicas macroscópicas ( $69.9 \pm 13.2 \text{mm}^2$ ) e microscópica caracterizada por dano hemorrágico, edema e perda de células epiteliais. No entanto, a administração do polissacarídeo reduziu de forma dose dependente, as lesões gástricas induzida por etanol, com todas as doses testadas (3, 10, 30 e 90 mg/kg do polissacarídeo, v.o). De todas as doses do polissacarídeo utilizadas experimentalmente, a dose de 30 mg/Kg ( $5.0 \pm 3.7 \text{mm}^2$ ) foi a que apresentou o maior efeito gastroprotetor na mucosa (nível de significância de  $p < 0,05$ ), diminuindo em aproximadamente 90% o tamanho da lesão.

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 glutathiona quando comparado ao grupo controle (apenas salina). Entretanto, a administração prévia do polissacarídeo nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg aumentou os níveis de GSH até valores semelhantes aos normais. Nossos dados estão de acordo com outros autores que mostram que o etanol depleta o nível de glutathiona nos tecidos do estômago e que a restauração parece ser importante na gastroproteção<sup>6,8</sup>.

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 os níveis gástricos de malondialdeído produzidos pelo etanol.

No trabalho avaliou-se ainda o efeito do polissacarídeo na secreção gástrica. O polissacarídeo na dose 30 mg/kg em camundongos após 4 horas de ligadura do piloro, não ocorre alterações significativas no volume de suco gástrico, pH e total de acidez quando comparado ao grupo tratado apenas com solução salina. Por outro lado, quando prétratados com histamina houve um aumento do volume ( $993\pm 90.8$ ) e do total de acidez ( $10\pm 0.6$ ) quando comparado com o grupo controle (salina,  $504\pm 39.2$  e  $5.0\pm 0.3$ , respectivamente).

## CONCLUSÃO

- ✓ Este estudo sugere que o polissacarídeo sulfatado extraído de *Gracilaria caudata* exerce efeito gastroprotetor na lesão induzida por etanol.
- ✓ O polissacarídeo preveniu o consumo de glutathione (GSH) e o aumento da peroxidação lipídica na mucosa gástrica, induzidos pela administração de etanol.
- ✓ O tratamento do polissacarídeo não alterou a atividade secretora ácida gástrica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAVATI, B.; FERNANDEZ, V. O., Algas perifíticas em dois ambientes do baixo rio Doce (lagoa Juparanã e rio Pequeno – Linhagens, Estado do Espírito Santo, Brasil: variação espacial e temporal. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.30, n.4, p.439-448, 2008.
2. FONSECA, R. J. C.; OLIVEIRA, S. N. M. C. G.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MOURÃO, P. A. S., Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, v.99, n.3, p.539-545, 2008.
3. GUSLANDI, M. Effect of ethanol on the gastric mucosa. **Dig. Dis. Sci**, v. 5, p. 21-32, 1987.
4. MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem.**, v. 86(1), p. 271-278, 1978.
5. OATES, P. J.; HAKKINEN, J. P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, v. 1, n. 1, p. 1-117, 1988.
6. OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; FLORÊNCIO, M.G.; LIMA JR, R.C.P.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, p. 105–111, 2004.
7. SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 24;25(1), p. 192-2005, 1968.
8. SZABO S, TRIER, J.S.; FRANKEL, P. W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, v. 214, p. 200, 1981.
9. VISSCHER, FE.; SEAY, PH.; TAZELAAR, AP Jr.; VELDKAMP, W.; VANDER BROOK, MJ. Pharmacology of pamine bromide. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.110(2), p. 188-204, 1954.

**PALAVRAS-CHAVE:** sulfeto de hidrogênio. óxido nítrico. etanol.