

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DE UMA GALACTANA
SULFATADA EXTRAÍDA DE *Gracilaria caudata* EM CAMUNDONGOS -
POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DA VIA NO/cGMP/PKG/ K_{ATP}**

*Francisco das Chagas Vieira Júnior (Bolsista ICV - Iniciação Científica Voluntária), André
Luiz dos Reis Barbosa (Orientador ICV - Iniciação Científica Voluntária, Dep. Fisioterapia –
UFPI/Parnaíba)*

INTRODUÇÃO

As algas marinhas possuem uma diversidade biológica e habitam em variados ambientes (RAVEN et al., 2001). A composição das algas rodófitas é composta por uma matriz extracelular de galactanas sulfatadas (TRUUS et al., 2006). Diversas atividades biológicas podem ser exercidas por polissacarídeos sulfatados, tais como ações antiinflamatórias, anticoagulantes e analgésicas (SRIVASTAVA & KULSHVESHTHA, 1989, YAMADA, 1994; CAPEK et al. 2003; NERGARD et al., 2005). Assim, essas atividades têm demonstrado a importância das algas marinhas como fonte importante de pesquisa de substâncias com potencial de aplicação farmacológica (BITENCOURT et al., 2008).

Em resposta ao dano no tecido e inflamação, a dor inflamatória é iniciada. O sistema nociceptor é ativado por mecanismos periférico ou central. A formalina ou carragenina são usadas como substâncias irritativas para estímulo inflamatório em modelos animais. (SCHMIDTKO et al., 2009). Assim, a sensibilização dos receptores da dor denominam a dor inflamatória, o que descreve um estado hiperalгésico no ser humano e hipernociceptivo em animais (BRITO et al., 2006).

A literatura demonstra que a liberação de óxido nítrico (NO) é crucial para sensibilização central de vias intracelulares da dor durante a dor inflamatória e neuropática (SCHMIDTKO et., 2008). O NO uma vez sintetizado, pode difundir-se para algumas células, onde reage o grupo heme da guanilato ciclase solúvel gerando cGMP para GTP (MURAD et al., 2006), o qual a proteína kinase G (PKG) é ativada. Assim, com ativação de cGMP é promovido a abertura dos canais de potássio ATP dependentes (K_{ATP}) (KAWANO et al. 2009), causando a hiperpolarização dos neurônios nociceptivos [CUNHA et al., 2010]

Estudos também demonstram a participação do NO derivado das nNOS na ação antinociceptiva periférica dos agonistas opióides. (HERVERA et al., 2009). A participação dos opióides na analgesia durante a inflamação aguda é mediada pela ativação periférica dos receptores opióides e da via NO/cGMP (POL et al., 2007 ; TODA et al., 2009).

Recentes estudos indicam que a fração do polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Gracilaria caudata* (PLS) tem um potencial antiinflamatório gastroproteror na gastropatia induzida por etanol (SILVA et al., 2011). Diante disso, considerando que as algas marinha são importantes fontes de pesquisa de novas substâncias químicas com potencial terapêutico de efeito antinociceptivo, este estudo tem com objetivo avaliar o efeito do PLS extraído da *Gracilaria caudata* na hipernocicepção induzida por carragenina em camundongos, evidenciando o possível envolvimento da via NO/cGMP/PKG/K_{ATP} e participação dos receptores opióides nesse processo hipernociceptivo

Metodologia

Forma utilizados camundongos Swiss machos com massa de 20 – 25 gramas provenientes do Biotério da Universidade Federal do Ceará - UFC e da Universidade Federal do Piauí – UFPI.

Foram utilizados 5 ou 6 animais por grupo experimental. Todos os animais que receberam tratamento com o PLS, a administração intraperitonealmente (*i.p.*) foi realizada 1 hora antes da administração de carragenina

PROTÓCOLOS

Atividade Antinociceptiva

Para analisar a capacidade antinociceptiva do polímero extraído da alga (polissacarídeo sulfatado), serão avaliadas as mediadas de pressão das patas em ponteiras, convertidas em unidades de força-gramas, através de um analgômetro digital Von Frey (Insight).

Avaliação da atividade antinociceptiva do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata*

Com a finalidade de avaliar possível atividade antinociceptiva do polissacarídeo de *Gracilaria caudata* foi utilizado o método de indução de reação inflamatória na pata de camundongos Swiss pela carragenina. Os animais 5 ou 6 foram divididos em grupos: Salina, Sal+Carragenina, e três grupos com a indução inflamatória com carragenina e as substâncias teste (PLS de *Gracilaria caudata*) em diferentes doses (2,5 mg/kg; 5 mg/kg; 10 mg/kg, respectivamente). Os tratamentos com o polissacarídeo extraído de *Gracilaria caudata* foram administrados pela via intraperitoneal (1 h) antes da indução estímulo pela injeção subcutânea de carragenina (300 µg/pata; 50 µL) na região subplantar da pata posterior direita. Nesse teste os animais serão transferidos para gaiolas individuais onde serão mantidos previamente por trinta minutos e condicionados a receber estímulos mecânicos no tempo zero (basal), que é antes do estímulo hiperalgésico, e três ou quatro horas após a administração do estímulo (Carragenina). Os resultados serão expressos como a variação da força expressa em gramas entre os tempos avaliados, isto é, a diferença entre o delta da força em gramas antes do estímulo hiperalgésico e o delta da força em gramas um determinado tempo após o estímulo (três e quatro horas após o estímulo).

Avaliação do potencial antinociceptivo do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* – papel da via do óxido nítrico na hiperalgesia induzida por carragenina.

Foi avaliada a atividade antinociceptiva do PLS de *Gracilaria caudata* mediante a injeção de estímulo induzida por carragenina (300 µg/pata; 50 µL) nas patas dos animais pelo aparelho Von Frey (Insight). O L-NOArg (100 ng/pata; 50 µL) foi administrado intraplantarmente uma hora antes da administração da carragenina e a L-arginina (200 mg/kg; 0,5 mL) foi administrada intraperitonealmente 10 minutos antes da administração do L-NOARG. O resultado será expresso como o delta da força em gramas, isto é, a diferença entre a força-grama antes do estímulo inflamatório (basal) e posteriormente esse estímulo (3 e 4hs).

Avaliação do potencial antinociceptivo do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* – papel da via guanilato ciclase solúvel na hipernocicepção induzida por carragenina.

Com o objetivo de verificar a participação da via NO/cGMP na atividade antinociceptiva mediada PLS de *Gracilaria caudata* o ODQ (8µg/pata; 50µL) será administrado 30 minutos antes do estímulo por carragenina. O resultado será expresso como o delta da força em gramas, isto é, a diferença entre a força-grama antes do estímulo inflamatório (basal) e posteriormente esse estímulo (3 e 4hs).

Avaliação do potencial antinociceptivo do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* - papel dos canais de potássio ATP dependentes (K⁺ATP) na hiperalgesia induzida por carragenina.

Para verificação da participação dos canais de potássio ATP dependentes na analgesia mediada PLS de *Gracilaria caudata*, será administrado glibenclamida (160µg/pata; 50µL) 30 minutos antes da carragenina na pata do animais. O resultado será expresso como o delta da força em gramas, isto é, a diferença entre a força-grama antes do estímulo inflamatório (basal) e posteriormente esse estímulo (3 e 4hs).

Avaliação do potencial antinociceptivo do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* com a participação da proteína kinase G (PKG) na diminuição da hiperalgesia induzida por carragenina.

Para verificação da participação da proteína kinase G na analgesia mediada PLS de *Gracilaria caudata* após a indução de estímulo induzida por carragenina (300µg/pata; 50 µL) nas patas dos animais, KT5823 (1,5 µg/pata; 50 µL) será administrado 30 minutos antes da carragenina na pata dos animais. O resultado será expresso como o delta da força em gramas, isto é, a diferença entre a força-grama antes do estímulo inflamatório (basal) e posteriormente esse estímulo (3 e 4hs).

Avaliação do potencial antinociceptivo do polissacarídeo sulfatado da *Gracilaria caudata* - papel dos opióides endógenos.

Os animais foram pré-tratados com PLS (2.5mg/Kg, ip.) 1 hora antes da administração carragenina. Após 30 minutos da administração PLS, naloxona (1 ug/ pata; injeção intraplantar 50 ul). Trinta minutos após a administração de naloxona, carragenina (50 ul; 300µg/) foi administrada na pata direita camundongos. Em seguida, o limiar nociceptivo foi medido na pata direita e determinada como descrito acima

Resultados e Discussão

Podemos observar que nos grupos experimentais tratados com PLS tiveram uma redução da hipernocicepção induzida por carragenina (Carragenina, 3ª hora: 8,60 g ± 0,56 g/4ª hora: 8,84 g ± 0,70 g; PLS 2,5 mg/kg, 3ª hora: 2,14 g ± 0,65 g/4ª hora: 1,84 ± 0,12 g; PLS 5,0 mg/kg, 3ª hora: 2,90 g ± 0,81/4ª hora: 3,20 g ± 0,55 g; PLS 10 mg/kg, 3ª hora: 3,84 ± 0,75 g/4ª hora: 3,28 g ± 0,65 g). A fração do polissacarídeo aumenta o limiar hipernociceptivo induzido por carragenina de maneira que no gráfico dose-reposta, a reação máxima do efeito é da dose 2,5 mg/kg (3ª hora: 2,14 g ± 0,65 g/4ª hora: 1,84 ± 0,12 g). Então, esta dose foi selecionada para a investigação do possível mecanismo de ação no qual envolve a sinalização intracelular mediado pelo PLS, NO/cGMP/PKG/K_{ATP}.

Pode-se verificar a participação molecular do NO na redução da hipernocicepção induzida por carragenina nos grupos tratados com PLS, evidenciando o real envolvimento de sinalização intracelular do NO nesse processo hipernociceptivo inflamatório. O pré tratamento com inibidor inespecífico da NOS (L-Noarg) reverteu (3ª hora: 8,50 g ± 1,01 g/4ª hora: 9,02 ± 0,09 g) o efeito antinociceptivo induzido pelo PLS administrado (3ª hora: 1,15 g ± 0,54 g/4ª hora: 1,00 g ± 0,59 g). Nos animais não tratados com o PLS, o L-Noarg não aumentou a hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina. Em outro grupo, o substrato para produção de NO, L-Arginina foi capaz de reverter (3ª hora: 3,00 g ± 0,51 g/4ª hora: 2,70 g ± 0,55 g) o efeito do L-Noarg na hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina.

Utilizando uma abordagem farmacológica, foi demonstrado que o PLS fornece um efeito protetor(antinociceptivo) contra a hipernocicepção induzida por carragenina via NO / cGMP. Os animais tratados com ODQ (o inibidor de guanilato ciclase solúvel) reverteram (3ª hora: 11.52g ± 0,74 g/ 4ª hora: 11.22g ± 0,79 g) o efeito antinociceptivo induzida do PLS (3ª hora: 3.74g ± 1,01 g/ 4ª hora: 2.88g ± 1.07g). Em animais não tratados com PLS, o ODQ não aumentou a hipernocicepção inflamatória induzida pela carragenina. Com base nos dados da literatura e de acordo com nossos resultados, podemos inferir que o efeito antinociceptivo do PLS é via NO / GMPc dependente.

Há participação da proteína quinase G (PKG) nesse processo hiperalgésico do PLS, onde os grupos experimentais foram tratados com KT5823, inibidor inespecífico da PKG. Com o tratamento do PLS houve uma redução significativa da atividade antinociceptiva (3ª hora: PLS, 4,94±1,11 g/4ª hora: 3,72±1,20 g) em relação com os animais que receberam a administração de KT5823 (3ª hora: PLS+KT5823, 12,20±1,32 g; KT5823, 12,30±0,66 g/ 4ª hora: PLS+KT5823, 11,84±0,42 g; KT5823, 12,22±0,92 g).

O efeito antinociceptivos do PLS via NO/cGMP com a terminação com a despolarização dos canais de potássio ATP dependentes (KATP) favorecendo a dessensibilização neuronal periférica foi atestada, com administração de Glibenclamida, antagonista dos canais de KATP, o que reverteu a analgesia do PLS. A intensidade antinociceptiva do PLS foi significativa em relação grupos tratados com o antagonista dos canais KATP tanto na 3ª como na 4ª hora (3ª hora: PLS, 4,94±1,11 g; PLS + Glibenclamida, 11,94±0,64 g; Glibenclamida 11,82±1,00 g/ 4ª hora: PLS, 3,72±1,20 g; PLS + Glibenclamida, 11,62±1,00 g; Glibenclamida 11,14±1,18 g).

Diante da verificação da participação completa da via do NO no processo hiperalgésico do PLS, buscou-se a participação conjunta de outra via bioquímica analgésica, a via dos opióides. Para isso os grupos foram tratados com antagonistas dos receptores opióides, Naloxona. Verificou-se que a reversão da intensidade antinociceptiva ocorreu quando administrado Naloxona, entretanto a redução da intensidade nociceptiva do PLS foi estatisticamente significante em relação aos grupos tratados com o antagonista dos receptores opióides tanto na 3ª como na 4ª hora (3ª hora: PLS, 4,94±1,11 g; PLS + Naloxona, 9,40±0,80 g; Naloxona, 12,82±0,34 g/ 4ª hora: PLS, 3,72±1,20 g; PLS + Naloxona, 10,16±0,90 g; Naloxona, 12,36±0,54).

CONCLUSÃO

De acordo com os nossos resultados, podemos inferir que a fração estuda do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da alga marinha *Gracilaria caudata* tem efeito antinociceptivo na hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina em patas de camundongos. Estudos demonstram a participação do NO produzindo o efeito antinociceptivo na hipernocicepção induzida por carragenina (LIMA et al., 2010), assim os nossos resultados corroboram com a literatura que esse efeito antinociceptivo do PLS é dependente da participação intracelular do NO. Portanto, a atividade antinociceptiva da fração do PLS da *Gracilaria caudata* parece ter a participação da via NO/cGMP/PKG/ K_{ATP} , além do envolvimento dos opióides endógenos frente ao processo inflamatório de hipernocicepção induzido por carragenina em patas camundongos.

Referências Bibliográficas

- BITENCOURT, F.S., FIGUEIREDO, J.G., MOTA, M.R.L., BEZERRA, C.C.R., SILVESTRE, P.P., VALE, M.R., NASCIMENTO, K.S., SAMPAIO, A.H., NAGANO, C.S., SAKER-SAMPAIO, S., FARIAS, W.R. L., CAVADA, B.S., ASSREUY, A.M.S., ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* . **2008**, 377:139– 148.
- BRITO, G.A.C., SACHS, D., CUNHA, F.Q., VALE, M.L., LOTUFO, C.M. C., FERREIRA, S.H. RIBEIRO, R.A. Peripheral antinociceptive effect of pertussis toxin: activation of the arginine/NO/cGMP/PKG/ATP-sensitive K⁺channel pathway. *European Journal of Neuroscience* **2006**, Vol. 24, pp. 1175–1181.
- CAPEK, P.; HRIBALOVA, V.; SVANDOVA, E.; EBRINGEROVA, A.; SASINKOVA, V., MASAROVA, J. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2003**. v. 33, p. 113-119.
- CUNHA, T. M., ROMAN-CAMPOS, D., LOTUFO, C. M., DUARTE, H.L., SOUZA, G.R., VERRI, JR, W.A., FUNEZA, M.I., DIAS, Q.M., SCHIVO, I.R., DOMINGUES, A.C., SACHS, D., CHIAVEGATTO, S., TEIXEIRA, M.M., HOTHERSALL, J.S., CRUZ, J.S., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K γ /AKT/nNOS/NO/K ATP signaling pathway. *PNAS* **2010**. vol. 107.nº 9. 4442–4447.
- HERVERA, A., LEÁNEZ, S., NEGRETE, R., POL, O. The peripheral administration of a nitric oxide donor potentiates the local antinociceptive effects of a DOR agonist during chronic inflammatory pain in mice. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*. **2009**. 380:345 –352.
- KAWANO, T., ZOGA, V., KIMURA, M., LIANG, M.Y, WU, H.E., GEMES, G., MCCALLUM, J.B, KWOK, W.M, HOGAN, Q.H, SARANTOPOULOS CD. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. *Molecular Pain* **2009**. 5, 12
- LIMA, F.O., SOUZA, G.R., VERRI JR, W.A., PARADA, C.A., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q., CUNHA, T.M.. Direct blockade of inflammatory hypernociception by peripheral A1 adenosine receptors: Involvement of the NO/cGMP/PKG/ K_{ATP} signaling pathway. *PAIN*. **2010**.151, 506 –515.
- MURAD, F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *The New England Journal of Medicine* **2006**. 355 (19), 2003 –2011.
- NERGARD, C. S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: antiulcer, radical scavenging - and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**. v. 96, p. 255-269.
- POL, O. The involvement of the nitric oxide in the effects and expression of opioid receptors during peripheral inflammation. *Curr Med Chem* **2007**. 14:1945– 1955.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*, 6. ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan **2001**. p 906.

SCHMIDTKO, A., GAO, W., KÖNIG, P., HEINE, S., MOTTERLINI, R., RUTH, P., SCHLOSSMANN, J., KOESLING, D., NIEDERBERGER, E., TEGEDER, I., FRIEBE, A., GEISSLINGER, G. cGMP Produced by NO-Sensitive Guanylyl Cyclase Essentially Contributes to Inflammatory and Neuropathic Pain by Using Targets Different from cGMP-Dependent Protein Kinase. *The Journal of Neuroscience* **2008** . 28(34):8568 – 8576.

SCHMIDTKO, A., TEGEDER, I., GEISSLINGER, G. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends in Neurosciences*. **2009**. Vol.32 Nº.6.

SILVA, R.O., SANTOS, G.M.P., NICOLAU, L.A.D., LUCETTI, L.T., SANTANA, A.P.M., CHAVES, L.S., BARROS, F.C.N., FREITAS, A.L.P., SOUZA, M.H.L.P., MEDEIROS, J.V. R. Sulfated-Polysaccharide Fraction from Red Algae *Gracilaria caudata* Protects Mice Gut Against Ethanol-Induced Damage. *Mar. Drugs* **2011**, 9, 2188-2200.

SRIVASTAVA, R.; KULSHVESHTHa, D. K. Bioactive polysaccharides from plants, *Phytochemistry* **1989**. v. 28, p. 2877-2883.

TODA, N., KISHIOKA, S., HATANO, Y., TODA, H.. Modulation of Opioid Actions by Nitric Oxide Signaling. *Anesthesiology*. **2009**; 110:166 – 8.

TRUUS, K., TUVIKENE, R., VAHER, M., KAILAS, T., TOOMIK, P., PEHK, T., Structural and compositional characteristics of gelling galactan from the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* (Ahnfeltiales, the Sea of Japan) *Carbohydrate Polymers*. **2006**. v. 63, p. 130–135.

YAMADA, H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. *Carbohydrate Polymers* **1994**. v. 25, p. 269-276.

Palavras-chave:

Área: CV () CHSA () ECET ()