

# **AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DE UM POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA ALGA *Hypnea musciformis* SOBRE ANÁLISE DE MIGRAÇÃO NEUTROFÍLICA E LIBERAÇÃO DE CITOCINAS.**

*Rafael da Silva Prudêncio (Orientando ICV- Iniciação Científica Voluntária/UFPI), Tarcisio Vieira de Brito (Orientando ICV- Iniciação Científica Voluntária/UFPI), André Luiz dos Reis Barbosa (Orientador, departamento de fisioterapia/UFPI)*

## **INTRODUÇÃO**

A inflamação é definida como uma resposta complexa do tecido conjuntivo vascularizado frente a uma determinada injúria, na qual a resposta compreende eventos vasculares, celulares e linfáticos, tendo como finalidade a eliminação do agente lesivo, o estabelecimento da funcionalidade tecidual e a manutenção da homeostasia do organismo (MALE, 2006). Os produtos naturais representam fontes de diversidades moleculares na descoberta de drogas que tenham eficácia antiinflamatória.

Muitos tipos de polissacarídeos sulfatados (PLS), já são reconhecidos como tendo uma gama de atividades biológicas, incluindo anticoagulante (Cumashi et al., 2007), gastroprotetora (Silva et al., 2011) e atividades anti-inflamatórias (Rocha et al., 2006), o que pode dar-lhes relevância em aplicações farmacêuticas. Por fim, os resultados do presente trabalho mostram o potencial farmacológico do PLS da *Hypnea musciformis* como ferramenta para o estudo da inflamação e aplicação biotecnológica.

## **METODOLOGIA**

Utilizou-se camundongos Swiss machos, procedentes do Biotério Central da UFPI. Todos os tratamentos e procedimentos cirúrgicos realizados estavam de acordo com o guia de cuidado em uso de animais de laboratório do National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA) e esse projeto foi enviado para apreciação e posterior aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPI com o seguinte número de protocolo: Nº 23111.011979/11-80.

### **1. Modelo de peritonite**

Injetou-se em camundongos i.p. 250 µl salina estéril, indometacina 10mg/kg-1 e PLS 10 mg/kg. Uma hora depois, os animais foram injetados i.p. com 250 µl carragenina (500 g/cavidade) na cavidade peritoneal. Os camundongos foram eutanasiados depois de 4 h e a cavidade peritoneal foi lavada com 1.5 mL de PBS para colher as células peritoneais. Os volumes recuperados foram semelhantes em todos os grupos experimentais e eram equivalentes a aproximadamente 95% do volume injetado. Foi executada contagem de células totais em uma câmara de Neubauer e contagem de célula diferencial (100 células total) foram realizadas em lâminas depois da citocentrifugação e coradas com hematoxilina e eosina. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilo por mL de exsudação peritoneal. Alíquotas de exsudatos peritoneais foram armazenadas à -80°C para posterior análise de citocina e conteúdos de NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>.

## 2. Medida da citocina il-1

Amostras de fluido peritoneal foram coletadas e o nível de IL-1 $\beta$  foi avaliado usando ELISA. Resumidamente, anticorpo policlonal anti-camundongo IL-1 $\beta$  (4,0  $\mu$ g/ml); anticorpo policlonal anti-camundongo IL-1 $\beta$  (2,0  $\mu$ g/ml) foi diluído em 50  $\mu$ l de tampão PBS, foi usado para revestimento das placas de micro titulação. O bloqueio de locais de ligação não específicos foi realizado por incubação de placas com PBS contendo BSA a 2% durante 90 min a 37 °C. Após incubação a lavagem das placas de ensaio em tampão (0,01 M de fosfato 50 uL padrão IL-1 $\beta$ , ou a amostra) foi adicionado a cada poço e incubou-se durante a noite a 4 °C. Após lavagem das placas, 50 uL de coelho biotilado policlonal anti-camundongo IL-1 (1:1000) de anticorpo por 30 min a 37 °C foram adicionados às placas e incubadas durante 1 h à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas mais uma vez, e 50 uL de complexo HRP-estreptavidina (1:5000 de diluição, Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi adicionado a todos os poços, e os poços foram incubados durante 15 min com 50 uL de substrato (40 mg/poço). Após o desenvolvimento de cor, a reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico (1 M). A absorvância foi medida a 490 nm. Estes métodos de ELISA consistentemente detecta IL-1 $\beta$  em nível superior a 4000 pg/ml e não reagem de forma cruzada com outras citocinas. Os resultados são expressos como picogramas (pg) de cada citocina por cavidade peritoneal lavada.

## 3. Os papéis da aminoguanidina e L-arginina sobre o efeito inibitório do PLS na peritonite induzida por carragenina

Para avaliar a influência da aminoguanidina e L-Arginina sobre o efeito inibitório do PLS na peritonite induzida por carragenina, os camundongos foram injetados via i.p. com 250 uL salina estéril ou indometacina 10mg/kg<sub>1</sub> ou PLS 10 mg/kg<sub>1</sub>. Mais tarde, os animais foram co-tratados com L-Arg (500 mg/kg; 250 uL), mais AG (50 mg/kg; 250 uL) ou AG (50 mg/ kg; 250 uL) e apenas 30 min depois Cg (500 ug/cavidade) foi injetado via i.p. e a migração de neutrófilos foi determinada. Para a determinação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, os camundongos foram sacrificados 4 h mais tarde e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 ml de PBS para colher células peritoneais.

## 4. O papel do PLS nos níveis séricos de óxido nítrico (no<sub>3</sub>/no<sub>2</sub>) na peritonite

Os animais receberam injeções de 250  $\mu$ L de solução salina estéril ou PLS 10 mg/kg na cavidade peritoneal. Uma hora mais tarde, os animais foram injetados i.p. com 250  $\mu$ l de carragenina (500 $\mu$ g/cavity) na mesma cavidade. Quatro horas depois, os camundongos foram sacrificados e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 ml de PBS para a colheita de amostras de fluido peritoneal de animais. Fluidos peritoneais foram incubados em microplacas com nitrato redutase (0,016 U \* well-1) durante 12 h para converter NO<sub>2</sub> a NO<sub>3</sub>. A produção de óxido nítrico foi determinada medindo as concentrações de nitrito em um leitor de placas de ELISA a 540 nm, utilizando o método de Griess (Green et al. 1982). Os resultados foram expressos como micromoles de nitrito usando a curva padrão interno.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na peritonite induzida por carragenina, o PLS (10mg/kg) reduziu significativamente a migração de leucócitos quando comparado o grupo carragenina com o grupo administrado com PLS ( $7970,0 \pm 1078,0$  células/mL vs  $550,0 \times 10^3 \pm 97,47 \times 10^3$  células/mL) na contagem total. Além disso, a mesma dose de PLS também reduziu significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, na contagem diferencial ( $208,6 \times 10^3 \pm 46,84 \times 10^3$  células/mL vs  $4679,0 \times 10^3 \pm 317,3 \times 10^3$  células/mL). A carragenina induz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos através de um mecanismo indireto que envolve a ativação de macrófagos e à liberação de citocinas na cavidade peritoneal (Lo et al. 1982).

A administração intraperitoneal de carragenina foi necessária para induzir um aumento acentuado nas concentrações IL-1 no fluido peritoneal. O nível de IL-1 $\beta$  na cavidade peritoneal dos animais controle (grupo salina) foi  $729,6 \pm 45,3$  pg/mL, este aumentou para  $1230,0 \pm 76,94$  pg/mL após a injeção de carragenina. Comparado com o grupo carragenina, os animais pré-tratados com PLS (10 mg/kg, i.p.) apresentou uma concentração significativamente diminuída de IL1 $\beta$  peritoneal ( $621,1 \pm 9,2$  pg/mL).

A aminoguanidina (AG), quando coadministrada com PLS aumentou a contagem de leucócitos ( $4800 \pm 738,7 \times 10^3$  células/mL) quando relacionada ao PLS mais o grupo carragenina ( $1325,0 \pm 78,26 \times 10^3$  células/mL). L-arginina (L-Arg), quando coadministrada com PLS e AG diminuiu a contagem de leucócitos ( $425,0 \pm 156,1 \times 10^3$  células/mL) em relação a AG mais o grupo PLS ( $4800 \pm 738,7 \times 10^3$  células/mL). A mesma dose de AG também aumentou significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal ( $4788,0 \pm 737 \times 10^3$  células/mL) em relação ao PLS mais o grupo carragenina ( $1290,0 \times 10^3 \pm 85,73 \times 10^3$  células/mL). Quando coadministrada PLS e AG, L-Arg resultou numa diminuição na contagem de neutrófilos ( $424,0 \pm 154,1 \times 10^3$  células/mL) em relação a AG mais o grupo PLS ( $4788,0 \pm 737 \times 10^3$  células/mL).

O PLS mais o grupo carragenina mostrou um aumento do nível sérico de NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub> em fluido peritoneal ( $0,1022 \pm 0,006$  M) em relação ao grupo carragenina ( $0,756 \pm 0,003$  nM) ou o grupo de salina ( $0,0778 \pm 0,005$   $\mu$ M).

## CONCLUSÃO

Este estudo sugere que o PLS da alga *Hypnea musciformis* exerce efeito antiinflamatório na peritonite induzida por flogógeno por reduzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, este efeito parece ser mediado pela ativação da via de liberação de óxido nítrico (L-Arg./NO) no peritônio que foi confirmada pela medição dos níveis de NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub> que é um método utilizado para quantificar a produção endógena de NO, e também através da interferência na liberação de citocinas. Portanto, nossa substância possui componentes ativos com atividades antiinflamatória como demonstrado nos métodos empregados podendo constituir um potencial para fins terapêuticos.

## **BIBLOGRAFIA**

MALE, D. Introduction to the immune system. In: MALE, D.; BROSTOFF, J.; ROTH, D.B.; ROIT, I. Immunology. **Elsevier**. Ed. 7, p. 3-18, 2006.

GREEN LC, *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** 126:131–8, 1982.

ROCHA, ACC, FERNANDES, ES, QUINTÃO, NLM, CAMPOS, MM, CALIXTO, JB. Relevance of tumor necrosis factor- $\alpha$  for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. **Brit. J. Pharmacol**, 148:688-95, 2006.

SECCO DD, *et al.* Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, 9:153–164, 2004.

SILVA RO, *et al.* Sulfated-polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudate* protects mice gut against ethanol-induced damage. **Mar. Drugs**, 9:2188-200, 2011.

**Palavras – Chave:** Polissacarídeo. Inflamação. migração.