



Ação dos Polissacarídeos Sulfatados da alga verde *Caulerpa mexicana* em modelos clássicos de dor.

José Gerardo Carneiro^{1,2}, Edfranck de Sousa Oliveira Vanderlei³, Ana Luíza Gomes Quinderé³, José Ariévilo Gurgel Rodrigues⁴, Ianna Wivianne Fernandes de Araújo⁴, Norma Maria Barros Benevides⁵

¹Professor do Instituto Federal do Ceará – IFCE. e-mail: gerardo@ifce.edu.br

²Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFC.

³Doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFC.

⁴Doutor em Biotecnologia.

⁵Professora do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFC.

Resumo: A nociceção é alterada nas lesões teciduais, devido à liberação de mediadores inflamatórios a partir de células danificadas. Os polissacarídeos sulfatados são polímeros complexos e heterogêneos formados de unidades repetitivas e rico em radicais sulfatados, que têm sido descritos na literatura como agentes com potencial antinociceptivo. Assim buscamos avaliar a atividade antinociceptivo dos polissacarídeos sulfatados da alga verde *Caulerpa mexicana* em modelos clássicos de dor, induzidos por agentes químicos e térmicos. As algas foram coletadas na praia de Flecheiras - Trairi - Ce, em agosto de 2011 e transportada ao laboratório CARBOLEC-DBBM-UFC, sendo lavadas com água corrente e seca à sombra, depois triturada em moinho elétrico e armazenada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os polissacarídeos sulfatados foram extraídos pelo método enzimático. A avaliação da atividade antinociceptiva se deu através dos ensaios de Formalina a 1% e Placa Quente. O tratamento dos animais com polissacarídeos sulfatados (5; 10 ou 20 mg kg⁻¹; i.v.), 30 min. antes do estímulo químico (formalina 1%), não reduziu o tempo de lambertura da pata na primeira fase do ensaio, na segunda fase, os resultados mostram ação analgésica significativa (p<0,001) na dose de 10 (88,6%; 12,06 ± 7,78 mL) e 20 (98,5%; 6,37 ± 5,51 mL) de forma dose dependente. Não foi observado ação antinociceção no ensaio da placa quente, ou seja, nenhuma das doses foi capaz de induzir aumento do período de latência em nenhum dos intervalos avaliados. Sugerimos que o PS da alga verde *Caulerpa mexicana* tem atividade antinociceptiva de ação periférica e que pode está relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios.

Palavras-chave: Nociceção, Carboidratos sulfatados, Chlorophytas

1. INTRODUÇÃO

A nociceção pode ser definida como a detecção de estímulos nocivos e a subsequente transmissão de informações codificada para o cérebro. Em contraste, a dor é essencialmente um processo perceptivo que surge em resposta a essa atividade (KIDD; URBAN, 2001).

A nociceção é alterada nas lesões teciduais, devido à liberação de mediadores inflamatórios a partir de células danificadas, incluindo íons (K⁺ e H⁺), bradicinina, histamina, serotonina, TNF- α , ATP, derivados da COX e óxido nítrico. Alguns destes mediadores ativam nociceptores periféricos diretamente e leva a dor espontânea, enquanto que os outros atuam indiretamente, através de células inflamatórias para estimular a liberação de outros agentes indutores da dor (KIDD; URBAN, 2001; KRAYCHETE *et al.*, 2006).

Os modelos utilizados na triagem de moléculas com potencial antinociceptivo comumente baseiam-se na observação da resposta animal frente à utilização de estímulos de diversos tipos e duração, dessa forma, os modelos experimentais utilizados no estudo da dor são divididos em três categorias, sendo classificados de acordo com os mecanismos de desencadeamento do efeito nociceptivo, podendo ser os que utilizam estímulos mecânicos, térmicos e químicos (ALMEIDA & OLIVEIRA, 2006; LE BARS *et al.*, 2001).

Nos últimos anos as empresas farmacêuticas começaram a olhar para organismos marinhos, incluindo algas, em sua busca por novas drogas a partir de produtos naturais. Estes produtos são



também cada vez mais utilizados nas pesquisas médicas e bioquímicas (SMIT, 2004; MAYER, 2010; PATEL, 2012).

Polissacarídeos sulfatados (PS) são polímeros complexos e heterogêneos formados de unidades repetitivas de açúcares carregados negativamente devido à presença de radicais sulfatados, encontrados em grandes quantidades nas algas marinhas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; MATHEWS, 1975; AQUINO *et al.*, 2011). Os PS de algas verdes do gênero *Caulerpa* tem sido relatados como moduladores de uma série de funções biológicas, principalmente ação antinociceptiva e antiinflamatória (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Estudos realizados com extratos e frações de polissacarídeos sulfatados de algas, obtidos através de extração enzimática, demonstram uma variedade de atividades antinociceptiva em modelos de estudos clássicos de dor por indução química (ácido acético e formalina) e por indução térmica (placa quente). O estudo tem como objetivo avaliar a atividade antinociceptiva do PS da alga verde *Caulerpa mexicana* em modelos clássicos de dor, induzidos por agentes químicos e térmicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As algas marinhas da espécie *Caulerpa mexicana* foram coletadas na praia de Flecheiras no município de Trairi - Ce, em agosto de 2011 durante a maré baixa (-0,1 a 0,3 m). Sendo acondicionada em sacos plásticos e transportada ao laboratório CARBOLEC-DBBM-UFC, em recipiente isotérmico, onde foram limpas, tendo as epífitas removidas, e lavadas com água corrente e depois estocadas a -20 °C, para posterior utilização. Em um segundo momento as algas foram descongeladas, novamente lavadas com água corrente e seca à sombra, depois triturada em moinho elétrico e armazenada a temperatura ambiente, em recipiente plástico, tampado e ao abrigo da luz.

Foram utilizados camundongos machos *Swiss* obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC. A autorização para o uso dos animais nos experimentos foi obtida junto a Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA – UFC) como parte do projeto “Compostos bioativos de algas marinhas: bases moleculares, implicações terapêuticas e industriais” aprovado sob o processo de número 80/10. Estando de acordo com a Lei de Experimentação Animal (11.794/08).

A extração dos PS procedeu de acordo com Farias *et al.* (2000). As dosagens de carboidratos totais foram determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956); as de sulfato livre por hidrólise ácida (HCl 1 M, 5 horas, 105°C) por turbidimetria e lido em espectrofotômetro a 500 nm pelo método da gelatina-bário (DODGSON & PRICE, 1962); as concentrações de proteínas contaminantes foram realizadas segundo o método de Bradford (1976).

A avaliação da atividade antinociceptiva do PS se deu através do ensaio de Formalina a 1% na pata de camundongos segundo Hunskaar *et al.* (1985) e pelo da Placa Quente segundo Eddy e Leimbach (1953), os dados foram tratados através do programa estatístico Prisma, utilizando os testes ANOVA e de Bonferroni.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste da formalina é dividido em duas fases onde, a primeira fase do teste é caracterizada pela ação direta sobre os nociceptores e ativação das fibras-C, sendo chamada de fase neurogênica. A segunda fase é chamada de fase inflamatória, envolvendo a liberação de mediadores locais e sensível a drogas de ação periférica como AINEs e dexametasona (HUNSKAAR *et al.*, 1985).

O tratamento (i.v.) dos animais com PS (5; 10 ou 20 mg kg⁻¹; i.v.), 30 min. antes do estímulo químico (formalina 1%), não reduziu o tempo de lambadura da pata na primeira fase do ensaio (fase neurogênica). Na segunda fase, os resultados mostram ação analgésica significativa (p<0,001) na dose de 10 (88,6%; 12,06 ± 7,78 mL) e de 20 (98,5%; 6,37 ± 5,51 mL) (mg kg⁻¹; i.v.) de forma dose dependente. O grupo controle positivo morfina (5 mg kg⁻¹; s.c.) também foi capaz de reduzir o tempo de lambadura dos animais, em ambas as fases do teste. Enquanto, o grupo controle positivo indometacina (5 mg kg⁻¹) mostrou ação significativa somente na segunda fase do teste (55,6%; p < 0,05).



Este efeito corrobora com a literatura, que mostra que drogas específicas de ação central como a morfina diminuem o tempo de lambedura da pata dos animais em ambas as fases do teste e que antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) como a indometacina são de ação periférica, por inibir a nocicepção apenas na segunda fase do teste, 20-30 minutos após a injeção intraplantar de formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1987; LE BARS *et al.*, 2001; ALMEIDA E OLIVEIRA, 2006).

O teste da placa quente tem sido utilizado para avaliação de substâncias com propriedades nociceptivas que agem, principalmente, por via central (LE BARS *et al.*, 2001; GUPTA *et al.*, 2005). Neste método, o tempo de latência para a observação do comportamento de lambedura ou a retirada da pata do animal em resposta ao estímulo térmico gerado pela placa aquecida é utilizado como parâmetro para avaliação de atividade analgésica de determinado composto. Esses comportamentos são interpretados como respostas supra-espinhais, de integração cortical (LE BARS *et al.*, 2001; ALMEIDA & OLIVEIRA, 2006).

O tratamento dos animais com PS (5; 10 ou 20 mg kg⁻¹;i.v.), 30 min. antes do estímulo térmico, não produziu antinocicepção. Ou seja, nenhuma das doses foi capaz de induzir aumento do período de latência em nenhum dos intervalos avaliados. O tratamento com morfina (5 mg kg⁻¹), grupo controle, foi capaz de prolongar significativamente ($p < 0,001$) o tempo de resposta dos animais, enquanto o grupo indometacina (5 mg kg⁻¹) também não apresentou efeito antinociceptivo, comparado ao grupo salina.

Corroborando com o ensaio da formalina, o teste da placa quente confirmou a ausência de ação na dor neurogênica, mostrando que o PST da *Caulerpa mexicana* não tem propriedade antinociceptiva de ação central.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em conjunto, nos permitem sugerir que o PS da alga verde *Caulerpa mexicana* tem atividade antinociceptiva de ação periférica e que pode está relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios envolvidos na sensibilidade a dor.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F.R.C & OLIVEIRA F.S. **Avaliação de drogas analgésicas de ação central.** In: **Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 179-188, 2006.

AQUINO, R. S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A. M.; VALENTE, A. P.; ANDRADE, L. R.; MOURÃO, P. A. S. **Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms. evolutionary implications.** *Glycobiology*, v. 15, n. 1, p. 11-20, 2005.

ASSREUY, A.M.S. *et al.* **Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*.** *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Tóquio, v.31, n.4, p.691-695, May 2008.

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, p. 248-254, 1976.

COURA, C. O. *et al.* **Antinociceptive and anti-inflammatory activity of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*.** *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2011.

DALGLEISH, A. G.; O'BYRNE, K. J., **Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer.** *Adv. Câncer Res.* v. 84: 231-276, 2002.

DI ROSA, M. *et al.* **Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine.** *J Pathol*, v. 104, p. 15-29, 1971.



- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. **Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers.** Analytical Biochemistry, [S.l.], v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R.G. **Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymatic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters.** Biochemistry Journal, v. 78, p. 312-319, 1961.
- DUBOIS, M. *et al.* **Colorimetric method for determination of sugars and related substances.** Analytical Chemistry, v. 28, p. 350-356, 1956.
- EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. **Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 107, 385-393, 1953.
- EL GAMAL, A. A. **Biological importance of marine algae.** Saudi Pharmaceutical Journal. v. 18, p. 1-25, 2010.
- FARIAS, W.R.L. *et al.* **Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans.** Journal of Biological Chemistry, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.
- GUPTA, M. *et al.* **Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models.** J Ethnopharmacol. v. 98, n. 03, p. 267-273, 2005.
- HUNSKAAR, S. *et al.* **Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics.** Journal of Neurosciences Methods, v. 14, n. 1, p. 69-76, 1985.
- HUNSKAAR, S, HOLE, K. **The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain.** Pain. v.30, p.103-114, 1987.
- KIDD, B. L.; URBAN, L.A. **Mechanisms of inflammatory pain.** Br J Anaesth v. 87, p. 3-11, 2001.
- KRAYCHETE *et al.*, **Citocinas Pró-inflamatórias e Dor.** Rev Bras Reumatol, v. 46, n.3, p. 199-206, 2006.
- LE BARS, D. *et al.*, **Animal Models of Nociception.** Pharmacological Reviews. v.53, n.4, p.597-652, 2001.
- MATHEWS, M.B. **Polyanionic proteoglycans.** In: Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution Kleinzeller, Springer, G.F.; Witman, H.G. (eds). Berlin: Springer-Verlag, p.93-125, 1975.
- MAYER, A. M. S.; LEHMANN, V. K. B. **Marine pharmacology in 1998:** Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, antiinflammatory, anthelmintic, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities; with actions on the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems; and other miscellaneous mechanisms of action. Pharmacologist. v.42, p.62-69. 2000.
- PATEL, S. **Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings.** Biotech. 2012.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R.H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides.** New York: Academic Press, 1967. 219p.



RODRIGUES, J. A. G. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the marine green seaweed *Caulerpa cupressoides*. Pharmacological Reports, v. 64, p. 282-292, 2012.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. Journal of Applied Phycology. v.16, p.245–262, 2004.

WENDE, C. & MARGOLIN, S. Analgesic test based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. Fed Proc. v. 15, p 494-499, 1956.