AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA SEMENTE DA *Caesalpinia ferrea* EM CAMUNDONGOS

[1] Ana Clara Coelho da Costa; Danyela Maria Leal Rocha[2]; Fernando Mesquita de Sousa de Lima[2]; Maria da Graça Sales Furtado[2]; José Simião da Cruz Júnior[3] André Luiz dos Reis Barbosa[4].

[1] Graduanda em Biomedicina pela Universidade Federal do Delta do Parnaíba- UFDPar; [2] Graduando em Biomedicina pela Universidade Federal do Delta do Parnaíba- UFDPar; [3] Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal do Delta do Parnaíba- UFDPar; [4] Doutor em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará- UFC.

Área temática: Inovações em Farmacologia
Modalidade: Comunicação Oral
E-mail do autor: anaclaracoelho@ufpi.edu.br

RESUMO

INTRODUÇÃO: A inflamação é caracterizada pela coordenada ativação de várias vias de sinalização que regulam a expressão de mediadores tanto pró como anti-inflamatórios, acredita-se que outros polissacarídeos de espécies do gênero Caesalpinia, como o polissacarídeo extraído da semente da *C. ferrea*, possa apresentar ação anti-inflamatória e antinociceptiva no sistema gastrointestinal. **OBJETIVO:** Analisar a ação anti-inflamatória do polissacarídeo extraído da semente da *C. ferrea* sobre modelos de edema de para induzido por serotonina e sobre a migração leucocitária. **MÉTODOS:** Foram realizados experimentos in vivo, onde foram utilizados 6 animais por grupo (camundongos *Balb/C* machos). **RESULTADOS:** A dose de 10mg/kg (i.p.) do PLS extraído da *C. ferrea* foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) o volume da pata e a migração de leucocitária, uma vez que a migração de neutrófilos e macrófagos correspondem a terceira etapa vascular da inflamação, sendo assim, benéfica a redução do número de leucócitos. **CONCLUSÃO**: O PLS extraído da *C. ferrea* administrado na dose de 10mg/kg tem possível potencial efeito anti-inflamatório.

Palavras-chave: Inflamação; Polissacarídeo; Anti-inflamatório.

1. INTRODUÇÃO

A inflamação refere-se a um fenômeno dinâmico e multimediado que apresenta cinco sinais cardinais: rubor, calor, tumor, dor e perda de função (SHEN, 2016; RONCHETTI et al., 2017). É caracterizada pela coordenada ativação de várias vias de sinalização que regulam a expressão de mediadores tanto pró como anti-inflamatórios (MARNETT, 2012; SHEN, 2016). Apesar do recente progresso no desenvolvimento de novas drogas com fins terapêuticos, ainda existe uma busca exaustiva por anti-inflamatórios que sejam potentes e efetivos, particularmente com menos efeitos colaterais (RODRIGUES et al., 2019).

Acredita-se que outros polissacarídeos de espécies do gênero Caesalpinia, como o polissacarídeo extraído da semente da *C. ferrea*, possa apresentar ação anti-inflamatória e antinociceptiva no sistema gastrointestinal, tendo em vista que os polissacarídeos extraídos de plantas desse gênero já apresentam tal atividade biológica em outras pesquisas (BATISTA, 2017; MACEDO, 2020; HASSAN et al., 2015).

2. OBJETIVOS

Analisar a ação anti-inflamatória do polissacarídeo extraído da semente da *C. ferrea* sobre modelos de edema de para induzido por serotonina e sobre a migração leucocitária.

3. METODOLOGIA

Nos ensaios foram utilizados 6 animais por grupo (COSTA et al., 2020; SANTIAGO et al., 2015; SILVA et al., 2015; SOUSA, 2017), camundongos *Balb/C* machos, pesando 20-30 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura (22 ± 2°C) e ciclo claro/escuro (12h/12h) controlados. Todos os tratamentos e procedimentos foram realizados de acordo com o Guia de cuidados em uso de animais da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), ressaltamos que o presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (CEUA/UFDPar) sob protocolo Nº 017/20.

Os animais foram eutanasiados ao final de cada experimento pela utilização de uma dose letal de Quetamina (240 mg/kg) combinado com Xilazina (30 mg/kg) de acordo com a dose anestésica utilizada por Guazelli et al., 2013. Após a administração do anestésico foi feita a confirmação da morte do animal pela verificação da ausência de movimento respiratório (apneia) e ausência de batimentos cardíacos.

Para a escolha da melhor dose com a ação anti-inflamatória do PLS extraído da semente da *C. férrea*, foi utilizado inicialmente no edema de pata induzido por carragenina três concentrações diferentes de PLS (1, 3 e 10 mg/kg) administradas por via i.p em camundongos. Após a análise estatística dos resultados do edema de carragenina, a dose de 10 mg/kg demonstrou redução significativa (84%) e satisfatória no edema e foi a concentração escolhida para avaliação nos demais ensaios.

Para a realização do edema induzido por serotonina, os animais receberam somente o agente flogístico e também foram pré-tratados 30 min antes com melhor dose do PLS extraído da *C. ferrea*. O volume da pata dos animais foi mensurado por meio de pletismometria (Panlab LE75000), sendo as leituras realizadas antes da administração do agente (volume basal, Vo) 1, 2, 3 e 4 horas para a substância serotonina.

Para a determinação da migração leucocitária que inclui contagem total e diferencial de leucócitos, conforme metodologia descrita previamente por Souza e Ferreira (1985), foi realizado o ensaio de indução de peritonite que foram utilizados 24 animais divididos em 4 grupos contendo 6 animais cada (n=6). Inicialmente foi administrado por via i.p. salina 0,9% (grupo controle – grupo I) ou indometacina 10 mg/kg (grupo controle referência – grupo II) ou com melhor dose do PLS extraído da *C. ferrea* (grupo III) ou não receberam nenhum pré-tratamento (grupo não tratado – grupo IV). Uma hora depois, os animais receberam a injeção i.p. de 250 µl de carragenina (500 µg/cavidade) na cavidade peritoneal. Os camundongos foram eutanasiados depois de 4h da administração da carragenina ou salina e a cavidade peritoneal foi lavada com 1.5 mL de PBS para colher o fluido e as células peritoneais segundo metodologia adaptada por Chaves et al. (2013).

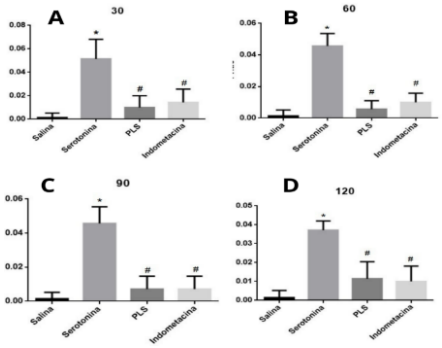
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dose de 10mg/kg (i.p.) do PLS extraído da *C. ferrea* foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) o volume da pata em 30min (Fig. 2A), 60min (Fig. 2B), 90min (Fig. 2C) e nos 120min (Fig. 2D). Na figura 1A, está a representação da medida do volume da pata nos primeiros 30 minutos após a injeção intraplantar da serotonina, onde ocorreu o pico máximo inflamatório do grupo controle positivo (0.051 ± 0.006****) que recebeu apenas a dose do agente flogístico quando comparado ao grupo salina (0.0 ± 0.0). Os grupos que foram pré-tratados intraperitonealmente com indometacina (0.014 ± 0.004****) e com o PLS (10mg/kg) (0.010 ± 0.003****) inibiram o aumento do volume da pata significativamente ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo Serotonina.

Na figura 1B, o gráfico em barras representa a variação do volume no edema de pata induzido por serotonina após 60min da indução. A administração de serotonina (0.045 ± 0.002****) causou edema, apresentando diferença estatisticamente significativa (p< 0,05) na comparação com o grupo salina (0.001 ± 0.001) quanto a variação do volume. O grupo indometacina (0.010 ± 0.002****) e o grupo PLS (0.005 ± 0.002****) em dose de 10mg/kg foram capazes de diminuir significativamente (p< 0,05) o volume do edema de pata induzido por serotonina nos 60min após a indução quando comparados ao grupo controle positivo.

Resultados similares foram observados aos 90 min e aos 120min, como representado na figura 1C e 1D, respectivamente, onde houve aumento significativo (p<0,05) do edema no grupo serotonina (0.045 ± 0.003****; 0.037 ± 0.001****) quando comparado ao grupo salina (0.001 ± 0.001; 0.0 ± 0.0) e redução significativa nos grupos pré-tratados com indometacina (0.007 ± 0.002****; 0.010 ± 0.003****) e com a dose do PLS (0.007 ± 0.002****; 0.011 ± 0.003****) quando comparados ao grupo serotonina.

Figura 1: Representação em barra da variação do volume no edema de pata induzido por serotonina.



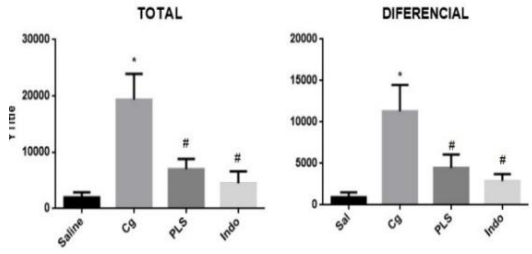
Fonte: imagem obtida através do software GraphPad Prism 6.
Legenda: Salina: grupo controle negativo; Serotonina: grupo controle positivo; PLS: Polissacarídeo extraído da *C. ferrea* na dose de 10mg/kg; Indometacina: droga de referência. * p< 0,05 quando comparado ao grupo Salina e # p< 0,05 quando comparado ao grupo Serotonina (ANOVA seguido pelo teste de teste de Newman Keuls).

A determinação da migração leucocitária é representada pelas figuras 2 quanto a contagem do número total e diferencial de células, respectivamente, presentes no lavado peritoneal após a indução de peritonite por carragenina.

Pode-se observar na representação gráfica que houve um aumento da migração leucocitária, tanto quando se refere a contagem total quanto diferencial, na administração de carragenina, apresentando diferença significativa (p<0,05) do grupo controle positivo em comparação ao grupo que recebeu

apenas salina. O PLS extraído da *C. ferrea* na dose de 10mg/kg foi capaz de reduzir significativamente ($p<0,05$) o número total e diferencial de células, sendo possível observar uma redução de 63,96% na migração de leucócitos para cavidade peritoneal dos animais, assim como a droga de referência indometacina, quando comparado ao grupo carragenina, uma vez que a redução do número de leucócitos é benéfica quando se trata do processo inflamatório.

Figura 2: Representação em barra da contagem do número total e diferencial de células presentes no lavado peritoneal



Fonte: imagem obtida através do software GraphPad Prism 6.
Legenda: Efeito do PLS de *C. ferrea* (PLS 10 mg/kg, v.o.) sobre o número total de leucócitos e neutrófilos presentes no lavado peritoneal de camundongos Balb/c com peritonite induzida por carragenina (500µg/cavidade, i.p.). O gráfico representa a média ± E.P.M. da contagem total do lavado peritoneal. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. *$p<0,05$ comparado com o grupo carragenina; #$p<0,05$ comparado com o grupo salina.

Nesse estudo, foi utilizado uma injeção intraplantar de serotonina para induzir o edema de pata, pois proporciona vasodilatação e aumento da permeabilidade dos vasos, consequentemente, ocasionando o edema típico da inflamação aguda (SHABBIR et al., 2018). Também realizou-se a análise da migração leucocitária, já que a migração celular, principalmente neutrófilos e macrófagos, correspondem a uma terceira etapa vascular da inflamação, em resposta a liberação de citocinas, quimiocinas, leucotrienos, interleucinas e TNF-αrealizando um percurso até o sítio da lesão (ROBBINS et al., 2016). De forma que, os leucócitos são os principais responsáveis pela remoção ou eliminação do agente agressor, porém sua atividade prolongada pode levar a danos em tecidos saudáveis e complicações do quadro inflamatório (DA SILVA, 2019; PINTO, 2016).

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no ensaio experimental, verifica-se que o PLS extraído da *C. ferrea* administrado na dose de 10mg/kg tem possível potencial anti-inflamatório, sendo capaz de reduzir os níveis de serotonina e o número de leucócitos no local da inflamação.

6. REFERÊNCIAS

BATISTA, Emanuelle Karine Frota et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE PREPARADOS À BASE DE JUCÁ (Caesalpinia ferrea Mart.). **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n. 3, 2017.

CHAVES, L. S. et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae Gracilaria caudata. Immunopharmacol Immunotoxicol, v. 35, p.93–100, 2013.

COSTA, L.E.C. et al. Chemical structure, anti-inflammatory and antinociceptive activities of a sulfated polysaccharide from Gracilaria intermedia algae. **Int J Biol Macromol**.159: 966-975. 2020.

DA SILVA, João Antônio Colussi et al. Uso do hormônio do crescimento associado à fibrina rica em plaquetas e leucócitos injetável (I-PRF). **Revista da Faculdade de Odontologia-UPF**, v. 24, n. 2, p. 309-315, 2019.

GUAZELLI, C.F.S.; FATTORI, V.; COLOMBO, B.B; GEORGETTI, S.R. Quercetin-Loaded Microcapsules Ameliorate Experimental Colitis in Mice by Anti-inflammatory and Antioxidant Mechanisms. J. Nat. Prod., v. 76, p. 200−208, 2013.

HASSAN, S. K. et al. Hypoglycemic and antioxidant activities of Caesalpinia ferrea Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 5, n. 6, p. 462–471, 2015.

MARNETT, L. J. Inflammation and Cancer: Chemical Approaches to Mechanisms, Imaging, and Treatment. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, p. 5224−5238, 2012.

MACÊDO, Nair Silva et al. Caesalpinia ferrea C. Mart.(Fabaceae) Phytochemistry, Ethnobotany, and Bioactivities: A Review. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3831, 2020.

PINTO, José de Oliveira et al. Cinética biomolecular de fatores de crescimento e colágeno envolvidos na cicatrização de pele tratada com plasma rico em plaquetas pobre em leucócitos: modelo experimental em equinos. 2016.

RONCHETTI, S.; MIGLIORATI,G. DELFINO, DV. Association of inflammatory mediators with pain perception. **Biomed Pharmacother.** 2017 Dec;96:1445-1452. doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.001. Epub 2017 Dec 6. PMID: 29217162.

RODRIGUES, LS; DA SILVA, ARA; MACÊDO, AAM. Noni (Morinda citrifolia Linn.): Determinação Fitoquímica e Potencial Antioxidante pelo Método DPPH. **Conexões-Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 47-54, 2017.

ROBBINS, SL CONTRAN. RS & KUMAR, V. **Patologia: Bases patológicas das doenças**. 9ºed. 2016

SILVA, Sandra Cabral da. Caracterização farmacológica pré-clínica da atividade anti-inflamatória de novos derivados N-Acilhidrazônicos. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SHEN, J. et al. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. **Connect Tissue Res**. 2017 Jan;58(1):49-63. doi: 10.1080/03008207.2016.1208655. Epub 2016 Jul 7. PMID: 27389927; PMCID: PMC5266560.

SOUSA, Stefany Guimarães. EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA SULFATADA EXTRAÍDA DE Morinda citrifolia (NONI). 2017.

SHABBIR, A. et al. Ziziphora clinopodioides ameliorated rheumatoid arthritis and inflammatory paw edema in different models of acute and chronic inflammation. **Biomedicine e pharmacotherapy** 97 (2018) 1710-1721.