

<b>Dados do Plano de Trabalho 1</b>	
<b>Título do Plano de Trabalho:</b>	Avaliação da atividade antinociceptiva da lectina extraída das sementes de <i>Dioclea violacea</i> (DVL)
<b>Modalidade de bolsa solicitada:</b>	PIBIC
<b>Projeto de Pesquisa vinculado:</b>	<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA LECTINA EXTRAÍDA DAS SEMENTES DE <i>Dioclea violacea</i> (DVL)</b>

## 1 OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo da lectina extraída das sementes de *Dioclea violacea* (DVL).

### Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antinociceptiva da *Dioclea violacea* (DVL) através dos testes de indução da nocicepção pela formalina e o teste da placa quente;
- Investigar os mecanismos de ações antinociceptiva e antiinflamatória da *Dioclea violacea* (DVL) por meio do teste da formalina através da associação da DVL com drogas que agem no sistema opióide (antagonista naloxona), com inibidor não seletivo de COX (indometacina) e com inibidor de citocina como TNF-  $\alpha$  (pentoxifilina).

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Animais

O protocolo experimental será encaminhado a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina do Cariri / Universidade Federal do Ceará. Todos os esforços serão feitos para minimizar o sofrimento dos animais segundo critérios da *Internacional Ethical Guidelines*. (CIOMS/OMS, 1985). Para a realização do estudo, serão utilizados camundongos machos adultos Swiss e ratos Wistar provenientes do Biotério de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina do Cariri – BIOE-XA/FAMED. Os animais serão aclimatados no Laboratório de Pesquisa em Neurociências e Neuroproteção - LAPENN, mantidos em temperatura ambiente controlada (21 a 23°C), alternância do ciclo claro/escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração, um dia antes dos testes.

### 2.2 Purificação da lectina de *Dioclea violacea* (DVL)

Espécie: *Dioclea violacea*

Extração: Extraído das sementes

Peso Molecular:  $\pm 25,5$  kDa (monômero)  
Especificidade da lectina: Manose e glicose  
Solubilidade: Solúvel em NaCl 0,15 M ou 0,9%

As sementes de *Dioclea violacea* serão descascadas e submetidas à maceração até se obter um pó fino na forma de farinha, apropriada para o processo de extração protéica. Será utilizada a cromatografia de afinidade em matriz de Sephadex G-75 onde a concentração de proteínas nas frações coletadas será monitorada por absorbância em comprimento de onda de 280 nm. Previamente, a farinha será submetida à extração protéica na proporção de 1:10 (m/v) em solução de NaCl 0,15 M por 4 horas. O extrato será aplicado à coluna previamente equilibrada com solução de NaCl 0,15 M contendo  $\text{CaCl}_2$  5 mM e  $\text{MnCl}_2$  5 mM. A fração não retida será eluída com a mesma solução de equilíbrio e a fração retida será eluída com NaCl 0,15 M e glicose 0,1 M. A fração retida, referente à lectina, será dialisada exaustivamente contra água destilada e liofilizada para posterior diluição e uso.

### 2.3 Drogas e reagentes

- Formalina a 1% v/v (Formaldeído PA /Aldeído Fórmico/ Formol,  $\text{H}_2\text{CO}$ , teor 36,5 – 38%, Dinâmica) para injeção de 40  $\mu\text{l}$  intraplantar.
- Sulfato de morfina pentaidratada (Dimorf®, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Solução Injetável 0,2 mg/ml) administrado na dose de 4 mg / kg, (ip).
- Indometacina (INDOCID®, Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda, cápsulas 25 mg,) administrado na dose de 10 mg/Kg (ip).
- Pentoxifilina (Pentoxifilina 400mg, Genérico EMS, Comprimidos revestidos de liberação prolongada) administrado nas doses de 0,5 e 0.1 mg/Kg (vo)
- Cloridrato de Naloxona (Narcan®, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Solução injetável 0,4 mg/ml) administrado na dose de 1 mg/kg (sc).

### 2.4 Protocolo experimental

#### 2.4.1 Teste da Formalina

Camundongos albinos - Swiss Webster (*Mus musculus*), machos adultos (20-25 g) serão usados para o teste da nocicepção induzida por formalina. Nesse experimento, serão injetadas 40  $\mu\text{l}$  formalina a 1% (v/v, intraplantar) na pata traseira direita dos animais e o tempo (em segundos) gasto pelo animal lambendo a pata será medido durante 5 minutos desde o início do teste (1ª fase, neurogênica) e 20 min depois (2ª fase, inflamatória), por 5 minutos cada tempo. Os animais serão divididos em cinco grupos (n=6 a 8 animais por grupo). Aos controles será administrada salina (0.1 mL/10g, i.p.). A morfina (4 mg/kg, i.p.) será usada como a droga de referência (controle positivo). Os animais serão pré-tratados com salina, morfina ou DVL nas doses 1, 5 e 10 mg/kg (ip) 30 minutos antes da injeção de formalina.

O teste da formalina consiste na aplicação de um estímulo químico (formaldeído a 1%) para indução da nocicepção em camundongos. O teste permite avaliar a resposta do animal a uma dor moderada e contínua causada pelo dano tecidual, bem como o papel de sistemas endógenos de regulação da dor. A formalina injetada na pata do

animal induz um efeito antinociceptivo bifásico. A primeira fase, ou fase neurogênica, deve-se a uma irritação direta das fibras C sensoriais e liberam alguns neurotransmissores ou mediadores, como a substância P. A segunda fase, ou fase inflamatória é caracterizada pela liberação de vários mediadores inflamatórios, como a serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandinas. As drogas de ação central podem inibir ambas as fases, como os narcóticos (morfina, por exemplo), enquanto que as drogas de ação periférica, como os antiinflamatórios não esteroidais (aspirina, por exemplo) e corticosteróides, inibem somente a segunda fase.

Para se verificar o envolvimento do sistema opióide no efeito antiinflamatório/antinociceptivo da *Dioclea violácea* (DVL) será utilizada a naloxona, antagonista seletivo do receptor opióide, administrado 15 minutos da DVL ou da morfina.

#### 2.4.4 Placa quente

O teste da placa quente é considerado um teste adequado para medir os efeitos de analgésicos opióides, e não é sensível aos efeitos analgésicos de antiinflamatórios não-esteróides. Camundongos serão submetidos ao teste da placa quente, os quais serão divididos em cinco grupos (n=6 animais/grupo): controle, tratados com morfina (4mg/Kg, ip) e tratados com DVL nas doses de 1, 5 e 10 mg/Kg (ip). O tempo de reação à estimulação térmica será determinado e o “cut-off time” será de 45 segundos.

#### 2.5 Análise Estatística:

A análise de distribuição normal dos dados será realizada para eleição do teste estatístico para análise dos resultados para constatação de hipóteses. Para comparações múltiplas será utilizada ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas em  $p < 0,05$ .

### 3. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PROJETO

	2019							2020				
Atividades	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5
Revisão/atualização de literatura	X								X	X	X	
Procriação e cuidados gerais com os animais	X	X	X	X	X	X	X	X				
Teste da indução da nocicepção pela formalina		X	X	X								
Teste da formalina com DVL associadas a drogas (naloxone, indometacina e pentoxifilina)					X	X	X					
Teste da placa quente							X	X	X	X		
Análise estatística e elaboração de resumo para apresentação em congresso											X	
Produção de artigo científico												X
Relatório final												X