

<b>Dados do Plano de Trabalho 2</b>	
<b>Título do Plano de Trabalho:</b>	Avaliação da atividade anti-inflamatória e analgésica 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 violácea* (DVL).

### Objetivos Específicos

- Investigar os mecanismos de ações antiinflamatória da *Dioclea violácea* (DVL) por meio do teste da peritonite induzida pela carragenina;
- Avaliar a atividade antinociceptiva da *Dioclea violácea* (DVL) através do teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.

## 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 CaCl<sub>2</sub> 5 mM e MnCl<sub>2</sub> 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**

- Carragenina lambda tipo IV ( $\lambda$ -carrageenan, plant mucopolysaccharide, Sigma Chemical Co., USA) a 1% (ip)
- Indometacina (INDOCID®, Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda, cápsulas 25 mg,) administrado na dose de 10 mg/Kg (ip).
- Fosfato dissódico de dexametasona (Corticoindex, Novafarma Indústria Farmacêutica Ltda, Solução injetável 4mg/mL) administrado na dose de 1 mg/kg (ip).

### **3.4 Protocolo experimental**

#### **2.4.1 Peritonite induzida pela carragenina**

A peritonite induzida em ratos pela injeção de carragenina (i.p.) é um modelo de inflamação aguda, amplamente utilizada na pesquisa de drogas antiinflamatórias. A injeção intraperitoneal de carragenina induz a migração de leucócitos para o local, cuja quantificação permite avaliar a influência de drogas no desenvolvimento deste parâmetro da resposta inflamatória, sendo particularmente sensível a antiinflamatórios esteróides. Além disso, a presença de vários mediadores inflamatórios pode ser avaliada e dosada no exsudato inflamatório obtido.

Para a realização deste teste, serão utilizados ratos machos wistar adultos (180-220 g), divididos em seis grupos (n=5 animais/grupo): os grupos serão pré-tratados com água destilada (controle sem carragenina), água destilada (controle com carragenina), dexametasona (controle positivo, 1mg/Kg; i.p.), DVL nas doses de 1 mg/Kg, 5 mg/Kg e 10 mg/kg (ip). Decorridos 30 minutos, estes animais receberão 0,25mL de carragenina a 1% (ip). Depois dos tratamentos, os animais serão devolvidos às caixas e deixados com livre acesso à ração e à água durante 4 horas. Após esse tempo, será feita a eutanásia dos animais por decaptação e o exsudato peritoneal será coletado com uma pipeta Pasteur plástica através de laparoscopia abdominal. Para facilitar a coleta, todos os animais receberão uma injeção de 1 mL de salina heparinizada (10 UI/mL), massageando-se o abdômen para soltar as células aderidas. Uma amostra do lavado peritoneal será diluída 1:20 em líquido de Türk e as células serão contadas em câmara de Neubauer.

#### **2.4.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético (Writhing Test)**

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, apesar de pouco específico, é usado para detectar tanto analgesia periférica como central. A administração intraperitoneal de ácido acético provoca um comportamento estereotipado em camundongos, caracterizada por contorções abdominais entre outros efeitos. Para a realização do teste serão usados camundongos Swiss (20-25g), os quais serão divididos em cinco grupos (n=8) e tratados com indometacina (10mg/kg), salina e DVL nas doses 1, 5 e 10 mg/kg (ip). Trinta minutos após os tratamentos, os animais serão injetados, pela via intraperitoneal com ácido acético 1% diluído em salina (0,1 mL/10g) e contado o número de contorções a cada 5 minutos, durante 30 minutos, relacionando graficamente as médias das contorções acumuladas em função do tempo (KOSTER *et al.*, 1959).

## 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 peritonite induzida pela carragenina		X	X	X	X	X						
Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético							X	X	X	X		
Análise estatística e elaboração de resumo para apresentação em congresso											X	
Produção de artigo científico												X
Relatório final												X