

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE UMA ESPÉCIE DA FAMÍLIA MALVACEAE EM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO ESTÉRIL INDUZIDOS POR HEME

Emanuel Junio Carneiro Barbosa¹, Aparecida Barros da Silva², Silvio Caetano Alves Júnior³, Gustavo Marinho Miranda⁴, Jaime Ribeiro Filho⁵

Resumo

Introdução: A inflamação é uma resposta orgânica a padrões de antígeno ou dano celular que leva a uma intensa migração celular que busca resolução do problema e reparo tecidual. Esta resposta pode se iniciar através de estímulos próprios como a hemina, levando a um tipo de inflamação denominada estéril. Para o combate deste processo é comum a utilização anti-inflamatórios não esteroidais, mas com alguns efeitos indesejados. **Objetivo:** O estudo busca avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de uma espécie da família Malvaceae. **Metodologia:** A indução da pleurisia foi realizada em camundongos suíços (n=6-8) com a hemina na concentração de 100nM. Os animais foram pré-tratados oralmente com extrato etanólico nas concentrações de 2,5mg/kg, 25mg/kg e 250mg/kg e fármacos controles 1h antes da indução. Decorrida 6 horas, foi realizada a coleta do lavado pleural para realização de contagens de leucócitos totais e diferenciais. **Resultados:** A dose de 250mg/kg foi a única eficaz na redução dos leucócitos totais, enquanto todas as doses foram eficazes na redução de leucócitos polimorfonucleares. **Conclusão:** Os resultados descritos no estudo evidenciam uma possível atividade anti-inflamatória do extrato, que ainda será analisado a fim de compreender seu mecanismo de ação.

Palavras-chave: Inflamação. Malvaceae. Pleurisia. Heme.

1. Introdução

A inflamação trata-se de uma resposta protetora destinada a eliminar a causa inicial de uma lesão celular, bem como as células e tecidos necróticos, e reparar o dano (KUMAR et al., 2013, p.29). Esta resposta tem como disparadores a identificação de padrões moleculares, que podem ser moléculas de antígenos ou de células próprias danificadas, sendo eles respectivamente os Padrões Moleculares associados ao Patógeno (PAMPs) e os associados ao Dano (DAMPs). O sistema imune inato reconhece os PAMPs e DAMPs e ativa diversas vias de sinalização e fatores de transcrição que induzem a expressão gênica de

1 Universidade Regional do Cariri, email: emanuel.junio@urca.br;

2 Universidade Regional do Cariri, email: aparecida.barros@urca.br;

3 Fiocruz Bahia, email: silvio.alves.bio@gmail.com;

4 Fiocruz Bahia, email: gustavomm@fiocruz.br;

5 Fiocruz Ceará, email: jaimе.ribeiro@fiocruz.br.

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



produtos importantes para a resposta inflamatória, como as citocinas e quimiocinas (ABBAS et al., 2019).

Quando a inflamação é iniciada por um DAMP, o processo é classificado como inflamação estéril, pois não há um microrganismo ou parte dele desencadeando a inflamação. Um exemplo de DAMP que pode gerar uma inflamação estéril é o heme, considerado um mediador importante de lesões vasculares, ou sua forma oxidada hemina, que são capazes de ativar TLR4, levando a uma resposta local com ativação leucocitária, tempestade de citocinas e gerar estresse oxidativo (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017).

Atualmente, os Anti-Inflamatórios não esteroidais (AINEs) são os mais comumente utilizados para reduzir a resposta inflamatória e seus sintomas. Porém, a utilização prolongada destes levam a uma gama de efeitos adversos que acometem o sistema gastrointestinal e cardiovascular, podendo ainda causar dano hepático, tornando importante o estudo de novas alternativas como o uso de plantas medicinais e seus derivados (ONG et al. 2007).

Plantas medicinais vêm sendo utilizadas há milhares de anos. Historicamente, diversas espécies foram utilizadas no tratamento de inúmeras desordens de saúde e no controle microbiano e antifúngico (DONADEL et al., 2022). Apesar de sua importante função na medicina popular e de fornecer poderosos efeitos terapêuticos, o risco de intoxicação causada pelo uso indevido deve ser sempre levado em consideração (GONÇALVES et al., 2022), o que justifica as pesquisas em relação à atividade destas plantas no corpo humano.

Diversas espécies da família Malvaceae vêm sendo usadas, entre elas a *Luehea divaricata* muito utilizada no Brasil e descrita empiricamente como tendo propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas (ROSA et al., 2014). Existem ainda diversos estudos que demonstram eficácia de outras espécies desta família no combate do processo inflamatório, como o extrato etanólico do cálice da *Hibiscus sabdariffa* L. (ALI et al., 2011), as folhas da *Brachychiton rupestris* e da *Brachychiton discolor* (THABET et al., 2018). Tendo isto em vista, torna-se promissor o estudo da atividade anti-inflamatória das plantas da família Malvaceae.

2. Objetivo

Avaliar das propriedades anti-inflamatórias do extrato etanólico de uma espécie da família Malvaceae em modelo murino de inflamação estéril induzido por heme

3. Metodologia

Os procedimentos adotados neste estudo foram submetidos à Comissão de Experimentação e Uso de Animais da Universidade Regional do Cariri, e aprovados sob o protocolo 00241/2022.2 O extrato foi cedido pela pesquisadora Dra. Yanna Teles da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), e por sua

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



solicitação, a espécie não será identificada devido ao sigilo por questão de patente.

Foram utilizados camundongos Swiss pesando entre 25 e 30g, provenientes do biotério da Universidade regional do Cariri (n=6-8). Antes do tratamento com o extrato, uma série de experimentos foram realizados para escolha da melhor concentração de hemina para indução do processo inflamatório (pleurisia). Os animais foram anestesiados e desafiados através de uma administração de Hemina (Sigma) nas concentrações de 50nM, 100 nM e 200nM na cavidade pleural (intratorácica). Após 6h, os camundongos foram anestesiados, eutanasiados e tiveram o tórax aberto dando acesso ao interior da cavidade pleural, possibilitando a consequente obtenção do lavado pleural, para isso foi utilizada uma solução de PBS heparinizado 0,1%, lavando o interior da pleural. Com auxílio de uma pipeta Pasteur o material foi coletado e conservado em microtubos (2mL) para posteriores análises.

O lavado foi então centrifugado, o sobrenadante congelado para posteriores análises, e as células totais foram contadas em câmara de Neubauer por microscopia ótica para avaliar a migração leucocitária. Ainda, lâminas foram confeccionadas utilizando *cytopspin* e foram coradas para a contagem diferencial dos leucócitos.

Definida a melhor concentração de hemina, outra série de experimentos foram realizados para avaliar o efeito do tratamento com o extrato. Inicialmente, os animais foram pré-tratados oralmente com o extrato nas concentrações de 2,5mg/Kg, 25mg/kg e 250mg/kg. Dexametasona (2mg/kg) e indometacina (10mg/kg) foram utilizados como controle positivo, e solução salina como controle negativo. Decorrida 1h dos tratamentos, a pleurisia foi induzida com hemina na concentração de 100nM. Após 6h, o lavado foi coletado para realizar as análises descritas anteriormente.

Ainda, outras análises serão realizadas. O sobrenadante será utilizado para dosagem de proteínas totais e mediadores inflamatórios como citocinas e eicosanoides. Já as células terão seu RNA extraído para avaliação da expressão gênica de genes relacionados com o processo inflamatório. Análises de perfil e composição química do extrato estão sendo realizadas pela equipe da Dra. Yanna Teles, e serão utilizadas posteriormente para melhor entendimento dos mecanismos de ação do extrato.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste One-way ANOVA no software Graphpad Prism 8.0.2. As diferenças entre os valores serão consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. Resultados

A fim de avaliar a melhor concentração de Hemina a ser utilizada como indutor da inflamação, foi realizada a contagem total e diferencial de leucócitos do lavado, mostrados na figura 1. A figura 1A e 1B mostram que a concentração de 100nM de hemina são capazes de estimular a quimiotaxia leucocitária, principalmente de polimorfonucleares, indicando um processo inflamatório local.

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



Devido a isto, a concentração de 100nM de Hemina foi escolhida para as análises.

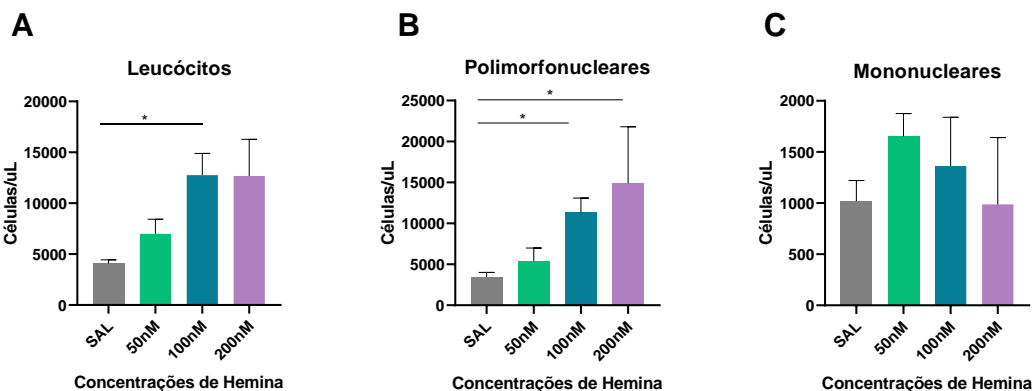


Figura 1: Contagem total e diferencial de leucócitos no lavado pleural de camundongos desafiados com heme. Valores absolutos de Leucócitos totais (A), Polimorfonucleares (B) e Mononucleares (C). Em cinza, animais estimulados com salina; em verde, azul e rosa, animais estimulados com hemina nas concentrações de 50nM, 100nM e 200nM, respectivamente. n=6-8. Os dados apresentados foram apresentados em média e erro padrão da média usando o teste One-way ANOVA (*p<0,05).

Com intuito de verificar a interferência dos extratos na migração leucocitária, foi realizada a contagem total e diferencial de leucócitos do lavado após os tratamentos, mostrados na figura 2.

A figura 2A mostra que apenas a concentração de 250mg/kg do extrato foi capaz de diminuir a migração leucocitária, se assemelhando a dexametasona, quando comparados aos animais não tratados. Já na contagem de polimorfonucleares (figura 2B), todas as concentrações do extrato reduziram a migração dessas células para o lavado, indicando uma diminuição na migração leucocitária característica da inflamação.

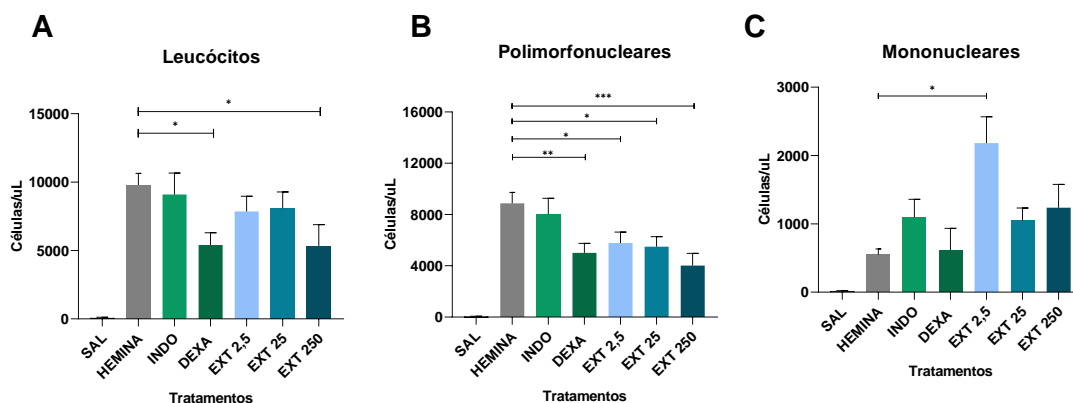


Figura 2: Contagem total e diferencial de leucócitos no lavado pleural de camundongos desafiados com heme e tratados. Valores absolutos de Leucócitos totais (A), Polimorfonucleares (B) e Mononucleares (C). Em cinza, animais estimulados com hemina e tratados com salina; em verde claro e escuro, animais tratados e com indometacina e dexametasona, respectivamente. n=6-8. Os dados apresentados foram apresentados em média e erro padrão da média usando o teste One-way ANOVA (*p<0,05).

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



dexametasona, respectivamente. Em azul ciano, azul claro e azul escuro, animais tratados com extrato na concentração de 2,5mg/Kg, 25mg/kg e 250mg/kg, respectivamente. n=6-8. Os dados apresentados foram apresentados em média e erro padrão da média usando o teste One-way ANOVA (*p<0,05).

5. Conclusão

Os resultados do presente estudo demonstram que a espécie utilizada apresenta uma possível atividade anti-inflamatória, uma vez que foi capaz de reduzir a migração de leucócitos para o local da inflamação, principalmente polimorfonucleares, células principais da inflamação aguda. Análises futuras serão realizadas para desvendar os mecanismos moleculares relacionados com a atividade anti-inflamatória.

6. Referências

ABBAS, Abul K.; PILLAI, Shiv; LICHTMAN, Andrew H.. Imunologia celular e molecular. 9 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

ALI, M.K. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiarrheal activities of ethanolic calyx extract of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Malvaceae) in mice. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao**, v. 9, n. 6, p. 626-631, jun. 2011. DOI: 10.3736/jcim20110608.

DONADEL, G. et al. Safety Investigations of Two Formulations for Vaginal Use Obtained from *Eugenia uniflora* L. Leaves in Female Rats. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 12, 1567 - 1580, 2022.

GONÇALVES, R. N. et al. Plantas medicinais na atenção primária à saúde: riscos, toxicidade e potencial para interação medicamentosa. *Revista de APS*, [S. l.], v. 25, n. 1, 2022.

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, 2017.

KUMAR, V. et al. Robbins & Cotran: Patologia. Patologia Básica. 9ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

ONG, C.K. et al. An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Clin Med Res**, v. 5, n. 1, p. 19-34, mar. 2007. DOI: 10.3121/cmr.2007.698.

ROSA, R. L. et al. Anti-Inflammatory, Analgesic, and Immunostimulatory Effects of *Luehea Divaricata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) Bark. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3, jul./sep., 2014. dx.doi.org/10.1590/S1984-82502014000300020.

THABET, A.A. et al. Study of the anti-allergic and anti-inflammatory activity of *Brachychiton rupestris* and *Brachychiton discolor* leaves (Malvaceae) using in vitro models. *BMC Complement Altern Med*, v. 18, n. 1, p. 299, nov. 2018.