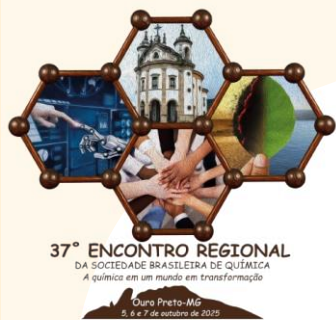




Avaliação dos efeitos da administração do alcaloide dicentrina, isolado de *Ocotea puberula*, *in vitro* e sobre a resposta inflamatória induzida por implantes de esponja em camundongos.

Bruno A. Ferreira (PQ)¹; Taís de C. Lima (PQ)²; Isabella S. Cassimiro (PQ)²; Danielle R. Napolitano (PQ)²; Daniela da C. Tristão (PG)¹; Maísa O. Linhares (G)³; João H. G. Lago (PQ)¹; Fernanda de A. Araújo (PQ)^{3*}.

¹ Centro de Ciências Naturais e Humanas - Universidade Federal do ABC, São Paulo. Brasil.

² Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

³ Laboratório de Fisiologia – Universidade Federal de São João del-Rei - Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Minas Gerais, Brazil.

e-mail: fearaujo@ufsj.edu.br

RESUMO

Ocotea puberula é planta nativa do Brasil, comumente utilizada na medicina tradicional. Estudos fitoquímicos desta espécie demonstram uma grande quantidade de alcaloides, incluindo a dicentrina. Apesar de algumas evidências de seu potencial anti-inflamatório, não há relatos quanto aos efeitos da administração da dicentrina sobre os componentes angiogênico e fibrótico quando concomitantes a resposta inflamatória. Assim, neste trabalho, foram avaliados o potencial citotóxico e anti-inflamatório de sua administração *in vitro*, em cultura de macrófagos RAW 264.7, bem como os seus efeitos sobre o conteúdo de hemoglobina, de colágeno solúvel e a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG) em implantes de esponja de poliéster-poliuretano em camundongos C57BL/6. Os resultados obtidos demonstram a baixa toxicidade da dicentrina, a redução de certos marcadores inflamatórios, do conteúdo de hemoglobina e um aumento da síntese de colágeno junto aos implantes.

Palavras-chave: dicentrina, produtos naturais, inflamação.

Introdução

O emprego de infusões e extratos brutos, ou parcialmente purificados, obtidos de cascas, folhas, frutos e raízes de plantas medicinais pela população brasileira, tem despertado o interesse tanto de pesquisadores, quanto da indústria farmacêutica, interessados na aplicação de seus princípios ativos para o tratamento de diferentes condições patológicas (1). Enquanto detentor de cerca de um terço da biodiversidade mundial, o Brasil ocupa uma posição privilegiada neste sentido. Entretanto, muito pouco dessa variedade de espécies foi avaliada quanto as suas propriedades terapêuticas (2). *Ocotea puberula* é uma espécie vegetal nativa do Brasil, muita usada na medicina tradicional por populações indígenas dos estados do Paraná e Santa Catarina, cuja análise fitoquímica de suas partes aéreas demonstrou uma grande quantidade de alcaloides com potencial aplicação biológica, incluindo a dicentrina (3). Dentre os efeitos já reportados e associados a este composto estão sua ação antinociceptiva e seu efeito antiproliferativo em diferentes linhagens tumorais (3,4). O objetivo deste projeto foi avaliar o potencial anti-inflamatório do alcaloide dicentrina, isolada de *Ocotea puberula*, tanto *in vitro* como *in vivo*, em um modelo pré-clínico de inflamação crônica.

Experimental

Análise de citotoxicidade e potencial anti-inflamatório in vitro

A viabilidade celular e o potencial anti-inflamatório da dicentrina foram avaliados em cultura de macrófagos RAW 264.7. A citotoxicidade deste alcalóide foi mensurada a partir do ensaio colorimétrico de MTT. Já o potencial anti-inflamatório foi avaliado a partir do método de Griess, que identifica a presença de nitritos em uma solução, evidenciando indiretamente a produção de óxido nítrico. Para esta avaliação as células foram incubadas com uma solução de LPS e zimosan. Para cada ensaio foram conduzidos três experimentos independentes.

Modelo de implante de esponja e regime de tratamento

Foram utilizados 40 camundongos C57BL/6 machos, com idade entre 8 e 10 semanas, pesando aproximadamente 25 g. Os animais foram cedidos e mantidos pela Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU). Todo o protocolo experimental, por sua vez, foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da UFU (CEUA/UFU, protocolo nº 23117.042533/2024-32). Um disco de esponja de poliéster-poliuretano (5 mm de espessura e 8 mm de diâmetro) foi assepticamente implantado no dorso de cada animal. Imediatamente após a cirurgia e por mais 8 dias, os animais receberam injeções intraimplantes contendo 0,1; 1 ou 10 µg de dicentrina, dissolvidos em 10 µL de solução DMSO 0,5%, ou contendo apenas o veículo do tratamento (grupo controle). No 9º dia, os implantes foram removidos, coletados e processados para as análises bioquímicas.

Dosagem de hemoglobina

O conteúdo de hemoglobina nos implantes foi mensurado utilizando

o reagente de Drabkin (Labtest – São Paulo). As amostras após todo o processamento foram pipetadas em uma placa de 96 poços e submetidas a leitura a 540 nm em uma leitora de microplacas.

Dosagem de colágeno solúvel

Os níveis de colágeno solúvel junto dos implantes foram mensurados a partir da formação e dissolução do complexo colágeno-picrosirius red, seguido de leitura em 540 nm (5).

Quantificação da atividade das enzimas MPO e NAG.

O infiltrado de neutrófilos e macrófagos junto ao sítio inflamatório foi indiretamente mensurado por meio da quantificação da atividade das ezimas MPO e NAG, respectivamente (6). Após o processamento, as amostras foram submetidas e leitura nos comprimentos de 450 e 400 nm, respectivamente.

Resultados e Discussão

O tratamento com a dicentrina não apresentou citotoxicidade e demonstrou um potencial anti-inflamatório in vitro.

Conforme observado na fig. 1A a administração do alcaloide dicentrina não reduziu a viabilidade celular dos macrófagos da linhagem RAW 264.7, apresentando inclusive uma baixíssima toxicidade frente a este tipo celular. Por outro lado, nas maiores concentrações avaliadas, a incubação das células com a dicentrina foi capaz de atenuar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos após a sua estimulação com LPSe zimosan, conforme observado na fig. 1B.

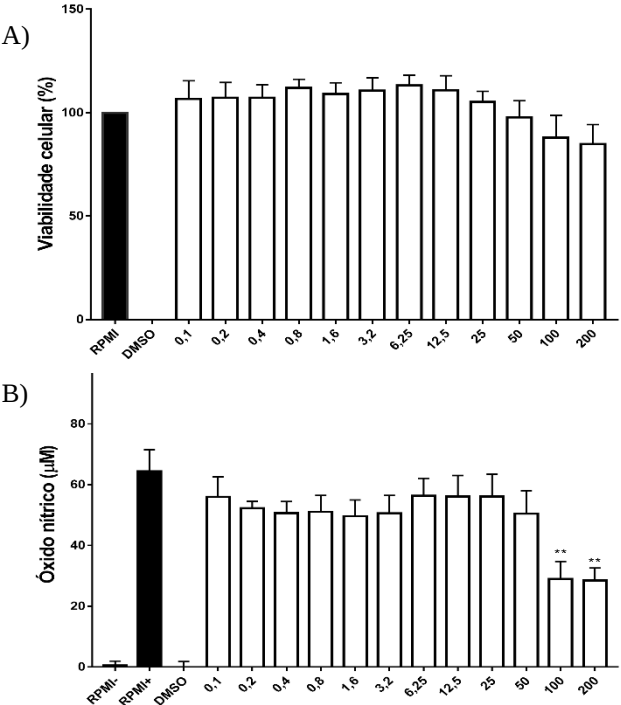


Figura 1. Resultados da administração do alcaloide dicentrina sobre cultura de macrófagos RAW 264.7. (A) representação gráfica da porcentagem de viabilidade celular. (B) produção de óxido nítrico. **p<0,01. ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

A administração da dicentrina foi capaz de modular os componentes do tecido fibrovascular induzido pelos implantes de esponja.

A presença dos discos de esponja no espaço subcutâneo dos camundongos induz uma resposta inflamatória do tipo corpo estranho. A matriz sintética, uma vez que não pode ser degradada, serve de arcabouço para a migração de células inflamatórias, novos vasos sanguíneos e para a proliferação de fibroblastos e subsequente deposição de matriz. Desta forma, é possível avaliarmos além da resposta inflamatória, processos como a angiogênese e a deposição de matriz (7). A administração intraimplante da dicentrina foi capaz de reduzir o conteúdo de hemoglobina junto dos implantes, ao menos

na maior dose avaliada. Por outro lado, tanto na concentração de 0,1, como 1µg, a administração do composto favoreceu a deposição de colágeno, principal constituinte da matriz extracelular. Por fim, em todas as doses testadas, foram observadas reduções significativas na atividade da enzima MPO. As mesmas não foram capazes de alterar a atividade da NAG.

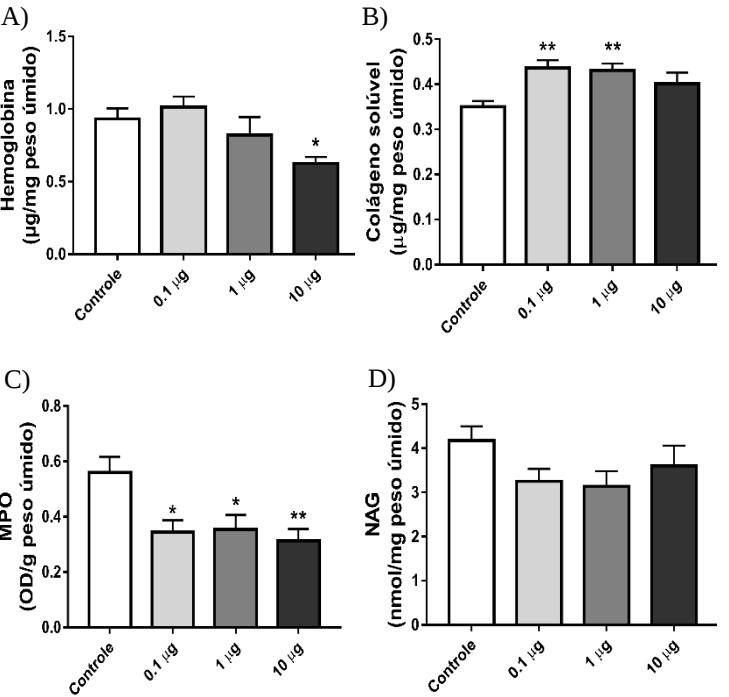


Figura 2. Efeitos da administração diária e intraimplante da dicentrina sobre os componentes do tecido fibrovascular induzidos pelos implantes de esponja. (A) Conteúdo de hemoglobina. (B) Níveis de colágeno solúvel. (C) Atividade da MPO. (D) Atividade da NAG. *p<0,05 e **p<0,01. ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

Conclusões

Nossos resultados evidenciam a baixa citotoxicidade e o potencial anti-inflamatório decorrentes da administração da dicentrina tanto in vitro, como in vivo. Além disso, a administração deste composto também foi capaz de alterar parâmetros associados a processos como a angiogênese e a deposição de matriz extracelular.

Agradecimentos

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (152604/2024-3); FAPESP e FAPEMIG.

Referências

- VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **2018**, v. 90, n. 1, 763–778.
- RIBEIRO, V. P. et al. *Pharmaceutical Biology*, **2018**, v. 56, n. 1, 253–268, 2018.
- MONTRUCCHIO, D. et al. *Planta Medica*, **2012**, v. 78, n. 14, 1543–1548, 2012.
- MONTRUCCHIO, D. P.; CÓRDOVA, M. M.; SOARES SANTOS, A. R. *PLoS ONE*, **2013**, v. 8, n. 7, 67730.
- CAMPOS, P. P. et al. *Histology and histopathology*, **2006**, v. 21, n. 12, 1263–1270.
- BARCELOS, L. S. et al. *Journal of Leukocyte Biology*, **2005**, v. 78, n. 2, 352–358.
- ANDRADE, S. P.; FERREIRA, M. A. N. D. *Methods Mol Biol*. **2016**. 333–343.