

EFEITOS DO EXTRATO DE *CECROPIA PACHYSTACHYA* E SUA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FLAVONOIDES SOBRE PARÂMETROS OXIDATIVOS EM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDO POR LPS

LARISSA MENEZES DA SILVEIRA¹; NATÁLIA PONTES BONA²; THAIS MARINI DA ROSA³; JULIA ARAÚJO DA SILVA⁴; MAYARA SANDRIELLY SOARES DE AGUIAR⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – larissamenezes1999@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nataliapbona@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – thr.marini@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – juliaaraujodsilva@gmail.com

⁵Universidade Federal do Ceará – mspereirasoares@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – francieli.stefanello@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A *Cecropia pachystachya* (CEC), popularmente conhecida como "embaúba", é uma espécie arbórea nativa do Brasil, com grande relevância por suas propriedades medicinais de uso tradicional (Machado *et al.*, 2021). É amplamente utilizada no tratamento de afecções pulmonares e renais, além de apresentar outras atividades farmacológicas promissoras, como propriedades anti-inflamatórias, diuréticas, anti-hipertensivas e antidiabéticas (Pacheco *et al.*, 2014; Mendonça *et al.*, 2016).

Em relação à composição fitoquímica da CEC destacam-se os flavonoides, como os C-glicosilados e O-glicosilados, além de ácidos clorogênicos, iridoides glicosilados e ácidos orgânicos (Gazal *et al.*, 2014). Vale destacar que os flavonoides foram descritos na literatura como potentes agentes neuroprotetores (Islam *et al.*, 2021), tornando a otimização do extrato de CEC em uma fração rica em flavonoides (FR-CP) um alvo interessante para estudos sobre neuroinflamação.

Tendo em vista os diversos efeitos biológicos da CEC, o aprofundamento de estudos na perspectiva de distúrbios neurológicos torna-se de interesse. Pesquisas prévias demonstraram sua capacidade em prevenir tanto o comportamento depressivo quanto danos oxidativos em camundongos submetidos ao estresse crônico. Ainda o extrato foi capaz de inibir os efeitos da cetamina em um modelo de transtornos de humor (Gazal *et al.*, 2014). Entretanto, os mecanismos por trás desses efeitos ainda não são compreendidos.

Avaliando o papel da neuroinflamação na fisiopatologia de variados distúrbios neurológicos, como depressão e Alzheimer, é extremamente relevante investigar os efeitos de CEC em um modelo de neuroinflamação. A indução de neuroinflamação por meio da administração periférica de lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos é um dos modelos biológicos mais utilizados para investigar os mecanismos bioquímicos e moleculares da neuroinflamação, além de ser útil na avaliação pré-clínica de nutracêuticos (Catorce & Geovorkian, 2016). Assim, o presente estudo objetivou investigar os efeitos do extrato de CEC e da FR-CP contra danos oxidativos no córtex cerebral de camundongos desafiados com LPS.

2. METODOLOGIA

2.1 Protocolo experimental

Camundongos machos de 60 dias foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil (CEEA 32979-2019). Os animais foram divididos em cinco grupos (n=8-10): I- controle; II- LPS (250 µg/kg); III- LPS + CEC 200 mg/kg; IV- LPS + FR-CP 50 mg/kg; e V- LPS + FR-CP 100 mg/kg. Durante duas semanas, os animais receberam água, CEC 200 mg/kg, ou FR-CP (50 ou 100 mg/kg) por via oral. Entre o 8º e o 14º dia, receberam LPS ou solução salina intraperitoneal.

2.2 Análise de parâmetros de estresse oxidativo

No final do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados, o cérebro removido, o córtex cerebral isolado e homogeneizado em tampão de fosfato de sódio. Após centrifugação a 2500 x g por 10 minutos a 4 °C, os sobrenadantes foram coletados para as análises.

2.2.1 Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROS)

O método é baseado na oxidação do diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína em diclorofluoresceína, conforme descrito por Ali et al. (1992). Os resultados foram expressos como µmol de DCF/mg de proteína.

2.2.2 Determinação da concentração de nitrito

A determinação foi feita pela reação de Griess, incubando a amostra com sulfanilamida e diidrocloridrato de N-1-naftiletilendiamina. A quantificação do nitrito foi realizada utilizando nitrito de sódio como padrão. Os resultados foram expressos como µM de nitrito/mg de proteína (Stuehr & Nathan, 1989).

2.2.3 Quantificação de TBARS

Baseado no método de Esterbauer e Cheeseman (1990), as proteínas foram precipitadas do sobrenadante com 10% de TCA. Em seguida, foi adicionado TBA (0,67%) e incubado a 100 °C por 30 minutos. Os níveis de TBARS foram expressos em nmol de TBARS/mg de proteína.

2.2.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada avaliando a inibição da auto-oxidação da adrenalina dependente de superóxido (Misra & Fridovich, 1972). Os resultados são relatados como unidades/mg de proteína.

2.2.5 Atividade da catalase (CAT)

Este método é baseado na capacidade da CAT de decompor H₂O₂, que foi monitorada por 3 min (Aebi, 1984). A atividade enzimática foi expressa como unidades/mg de proteína.

2.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Tukey. Foi considerada diferença significativa quando P<0,05. Os dados foram expressos com média ± erro padrão da média (SEM).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi observada uma elevação significativa na produção de EROS após a administração de LPS. Em contrapartida, os tratamentos com CEC e FR-CP (50 e 100 mg/kg) mostraram-se eficazes na redução dos níveis de EROS (**Figura 1A**). Adicionalmente, ambas as doses de FR-CP demonstraram a capacidade de prevenir o aumento nos níveis de nitritos induzido pelo LPS (**Figura 1B**). A administração de LPS também promoveu uma elevação nos níveis de TBARS, enquanto os tratamentos com CEC e FR-CP (50 e 100) atenuaram esses valores (**Figura 1C**).

A correlação entre a neuroinflamação induzida por LPS e a apoptose neuronal mediada por estresse oxidativo é amplamente relatada, ocorrendo por meio da promoção da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROS/ERN) e da ativação de caspases. Esses mecanismos estão associados ao comprometimento cognitivo e a diversas doenças neurodegenerativas (Singh *et al.*, 2022). Nesse contexto, os níveis de TBARS, indicadores de peroxidação lipídica, são uma consequência do estresse oxidativo e estão relacionados a danos neuronais e inflamação (Martínez & Campos, 2019). Logo, o controle e a redução das espécies reativas e seus derivados são cruciais para atenuar o dano neuronal, ressaltando a importância dos tratamentos investigados.

Adicionalmente, ao analisarmos a atividade das enzimas antioxidantes, observamos que houve uma redução na atividade da SOD e CAT induzida pelo LPS em comparação ao grupo controle. No entanto, o tratamento com FR-CP 100 foi capaz de restaurar a atividade de ambas as enzimas (**Figura 1D e E**). A elevação na atividade dessas enzimas antioxidantes provavelmente contribuiu na redução dos níveis de EROS, uma vez que essas enzimas atuam sequencialmente na inativação dos radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Cheng *et al.*, 2021).

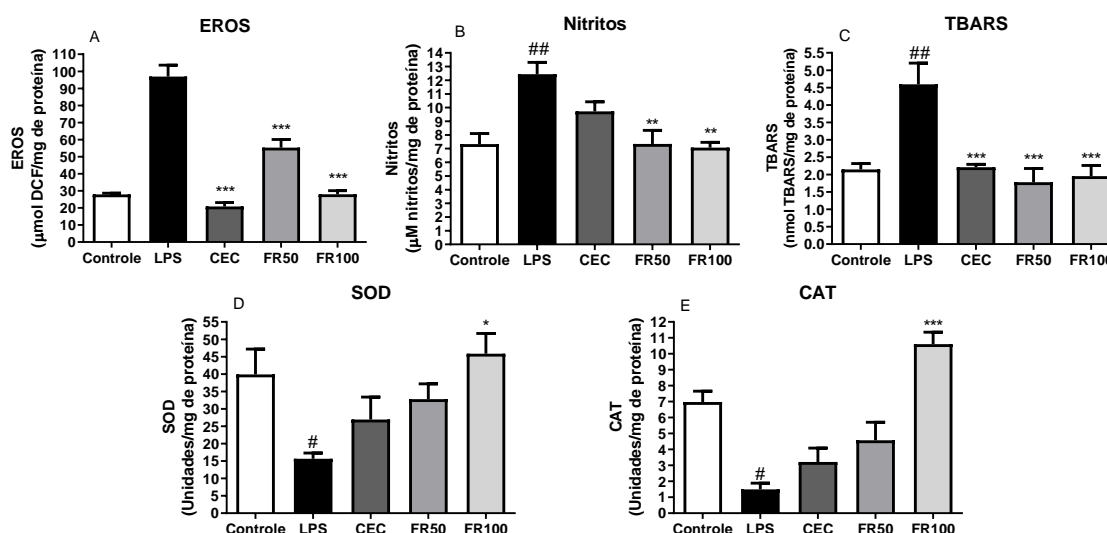


Figura 1. Efeito do extrato de *Cecropia pachystachya* (CEC) (200 mg/kg) e da Fração Enriquecida em Flavonoide (FR-CP) (50 e 100 mg/kg) nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) (A), nitritos (B), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS (C), assim como na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (D) e catalase (CAT) (E) no córtex cerebral de camundongos submetidos a um modelo experimental de neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS, 250 µg/kg). # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ em comparação ao grupo controle (veículo/salina). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, em comparação ao grupo veículo/LPS.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que o extrato de *C. pachystachya* e sua fração enriquecida em flavonoides são alvos terapêuticos promissores para o tratamento de doenças envolvendo o processo de neuroinflamação. Tais compostos demonstraram capacidade de atenuar parâmetros associados ao estabelecimento do estresse oxidativo, fomentando estudos futuros para uma melhor compreensão de seus possíveis mecanismos de ação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**, v. 302, 141–145, 2001.
- ALI, S. et al. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, p. 637- 648, 1992.
- CATORCE, M. N.; GEVORKIAN, G. LPS-induced Murine neuroinflammation model: Main features and suitability for pre-clinical assessment of nutraceuticals. **Current neuropharmacology**, v. 14, n. 2, p. 155–164, 2016.
- CHENG C. M et al. Effects of ciliate infection on the activities of two antioxidant enzymes (SOD and CAT) in captive coral (*goniopora columna*) and evaluation of drug therapy. **Biology**, v. 10, 2021.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 407–421, 1990.
- GAZAL, M. et al. Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. **Brain research bulletin**, v. 108, p. 10–17, 2014.
- ISLAM, M. S. et al. Neuropharmacological effects of quercetin: A literature-based review. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, p. 665031, 2021.
- MACHADO, C. D. et al. Ethnopharmacological investigations of the leaves of *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae): A native Brazilian tree species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 270, n. 113740, p. 113740, 2021.
- MARTÍNEZ LEO, E. E.; CAMPOS, M. R. Systemic oxidative stress: A key point in neurodegeneration - A review. **The journal of nutrition, health & aging**, v. 23, n. 8, p. 694–699, 2019.
- MENDONÇA, E. D. et al. Genotoxic, mutagenic and antigenotoxic effects of *Cecropia pachystachya* Trécul aqueous extract using in vivo and in vitro assays. **Journal of ethnopharmacology**, v. 193, p. 214–220, 2016.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of biological chemistry**, v. 247, p. 3170–3175, 1972.
- PACHECO, N. R. et al. *Cecropia pachystachya*: a species with expressive in vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant effects. **BioMed research international**, v. 2014, p. 301294, 2014.
- SINGH, S. et al. Lipopolysaccharide induced altered signaling pathways in various neurological disorders. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 395, n. 3, p. 285–294, 2022.
- STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **The journal of experimental medicine**, v. 169, n. 5, p. 1543–1555, 1989.