

Atividade imunomodulatória de extratos de Uvaia (*Eugenia pyriformis*) sobre macrófagos murinos**Immunomodulatory activity of uvaia extracts (*Eugenia pyriformis*) on murine macrophages**

DOI:10.34117/bjdv6n8-212

Recebimento dos originais: 08/07/2020

Aceitação para publicação: 14/08/2020

Alexandra Michelon

Estudante de graduação

Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste/Cascavel-PR

Endereço: Laboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Rua
Universitária, 2069 Cep: 85819-110 Cascavel-PR

E-mail: alex_m_01@hotmail.com

João Henrique de Souza

Mestre

Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste/Cascavel-PR

Endereço: Laboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Rua
Universitária, 2069 Cep: 85819-110 Cascavel-PR

E-mail: souza.joaohenrique@gmail.com

Izabela Virginia Staffen

Mestre

Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste/Cascavel-PR

Endereço: Laboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Rua
Universitária, 2069 Cep: 85819-110 Cascavel-PR

E-mail: izabela.staffen@gmail.com

Fernanda Weyand Banhuk

Mestre

Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste/Cascavel-PR

Endereço: Laboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Rua
Universitária, 2069 Cep: 85819-110 Cascavel-PR

E-mail: fernanda.banhuk@hotmail.com

Elissandro Jair Klein

Mestre

Instituição: Universidade de Campinas-UNICAMP/Campinas-SP

Endereço: Laboratório de Engenharia e Processos Ambientais, Departamento de Desenvolvimento
de Processos e Produtos, Av. Albert Einstein, 500 - CEP 13083-852 Campinas-SP

E-mail: elissandro.klein@hotmail.com

Edson Antonio da Silva

Doutor

Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste/Toledo-PR

Endereço: Laboratório de Processos Biotecnológicos e Separação, Centro de Engenharia e Ciências Exatas, Rua da Faculdade, 645, CEP: 85903-000 Toledo - PR - Brasil
E-mail: edsondeq@hotmail.com

Rafael Andrade Menolli

Doutor

Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste/Cascavel-PR
Endereço: Laboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Rua Universitária, 2069 Cep: 85819-110 Cascavel-PR
E-mail: rafael.menolli@unioeste.br

RESUMO

Extratos das sementes de *Eugenia pyriformis* têm mostrado uma promissora atividade contra *Leishmania* (parasita atualmente negligenciado) em ensaios *in vitro*, assim, estabelecer a sua relação com o sistema imune mamífero é importante para futuros experimentos *in vivo*. Este trabalho propõe o uso dos extratos de folhas de *E. pyriformis*, obtidos por extrações por ultrassom e CO₂ supercrítico, sobre macrófagos peritoneais de camundongos para avaliar uma possível ação imunoestimulatória do mesmo. Para tanto, os macrófagos foram obtidos por meio da infusão de 10 ml de solução salina tamponada (PBS) estéril a 4°C na cavidade peritoneal de camundongos C57Bl/6 previamente eutanasiados. As células obtidas foram utilizadas para a realização dos experimentos em placa de 96 poços. Uma vez as células aderidas, as mesmas receberam tratamento com diferentes concentrações dos extratos (1 a 175 µg/mL) diluídos em meio RPMI. Após 48 horas de incubação foi verificado no ensaio da produção de superóxidos a não ocorrência de indução sinérgica da produção desse radical após exposição por um indutor e os extratos. Da mesma forma, não foram verificadas diferenças em relação ao meio quanto a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. No ensaio de fagocitose verificou-se um aumento do estímulo para esta atividade no tratamento com o extrato obtido com CO₂ supercrítico, em sua maior concentração.

Palavras-chave: Extratos naturais, imunomodulação, leishmaniose.

ABSTRACT

Extracts of *Eugenia pyriformis* seeds have shown promising activity against *Leishmania* (currently neglected parasite) in *in vitro* trials, so establishing its relationship with the mammalian immune system is important for future *in vivo* experiments. This paper proposes the use of *E. pyriformis* leaf extracts, obtained by ultrasound and supercritical CO₂ extraction, on peritoneal mice macrophages to evaluate a possible immunostimulatory action. For this, the macrophages were obtained by infusing 10 mL of sterile buffered saline solution (PBS) at 4°C in the peritoneal cavity of previously euthanized C57Bl/6 mice. The cells obtained were used to perform the experiments in a 96-well plate. Once the cells were adhered, they were treated with different concentrations of the extracts (1 to 175 µg/mL) diluted in RPMI medium. After 48 hours of incubation, the superoxide production was verified in the superoxide production test that no synergistic induction of the production of this radical occurred after exposure by an inducer and the extracts. Similarly, no differences were found with respect to the medium for nitric oxide and hydrogen peroxide production. In the phagocytosis test there was an increase in the stimulus for this activity in the treatment with the extract obtained with supercritical CO₂, in its highest concentration.

Keywords: Natural extracts, immunomodulation, leishmaniasis.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária, que tem por agente etiológico protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, e que é transmitida por meio da picada das fêmeas de mosquitos do gênero *Lutzomyia* (Blanco; Nascimento-Júnior, 2017). Por ser uma doença de ocorrência predominante em países subdesenvolvidos, a leishmaniose representa um grave problema de saúde pública atual pois possui baixos investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, apesar dos fármacos de escolha atuais para o tratamento apresentarem problemas de alta toxicidade, além de requererem longos períodos de tratamento (Cavalcante; Vale, 2014).

No hospedeiro, a *Leishmania* spp. tem seu ciclo biológico essencialmente no interior dos macrófagos, e sua eliminação é dependente da ação coordenada de vários componentes do sistema imunológico, como as citocinas. Nas primeiras horas de infecção, a produção de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio pelos macrófagos constituem as mais efetivas respostas contra os parasitas, enquanto no decorrer da parasitose, TNF- α auxilia na indução do estresse oxidativo nos macrófagos (Rossi; Fasel, 2017, Freitas e Azevedo; Marcili, 2020).

Estudos realizados com *Eugenia pyriformis* (Uvaia), demonstraram a capacidade desta planta em apresentar uma atividade leishmanicida contra *L. amazonensis*, apresentando eficácia semelhante à de medicamentos utilizados atualmente no tratamento da doença (Kauffmann *et al*, 2016; Stieven *et al*, 2009). Dessa forma, a partir das atividades terapêuticas de *E. pyriformis* apresentadas pela literatura e da importância do sistema imunológico no combate da leishmaniose, o objetivo desse trabalho foi determinar a atividade imunomodulatória de extratos de Uvaia sobre macrófagos peritoneais murinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Preparo dos extratos: Os extratos das folhas de *Eugenia pyriformis* obtidos por extração com CO₂ supercrítico (E1) e assistida por ultrassom (E2), fornecidas pelo Laboratório de Processos Biotecnológicos e Separação do Centro de Engenharia e Ciências Exatas da Unioeste/Toledo, foram solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em meio RPMI, obtendo concentrações finais de 5, 10, 15, 50, 100, 150 e 175 μ l/ml.

Obtenção dos macrófagos: Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/Unioeste) sob o número 14/19. Os macrófagos utilizados foram obtidos a partir de lavagem peritoneal de camundongos C57Bl/6 usando PBS estéril. O “pellet” obtido após centrifugação foi ressuspenso em meio RPMI. Em seguida, os macrófagos foram plaqueados (2×10^5 células/poço) em placas de 96 poços e incubados por duas horas em estufa a 37°C sob 5% de

CO₂ para promover a aderência das células na placa. As células não aderidas foram posteriormente removidas por lavagem com PBS. Por fim, adicionaram-se os extratos preparados com meio RPMI, e incubou-se por 48h a 37°C em estufa com 5% de CO₂, após os quais foram realizados os testes abaixo descritos.

Verificação da produção de óxido nítrico (NO): Após as 48h de incubação, 100 µl de volume de cada poço foram adicionados em nova placa de 96 poços. Separadamente, também foram preparados 100 µL de uma curva padrão de nitrito de sódio nas concentrações de 5µM a 100 µM, em triplicata. Por fim, adicionaram-se 100 µL de reagente de Griess tanto na placa do experimento quanto na curva padrão e então realizou-se a leitura em leitor de microplacas a 550 nm.

Avaliação do efeito dos compostos sobre a produção de superóxidos: Após as 48h de incubação e posterior lavagem dos poços com PBS estéril, adicionaram-se 100µl de Solução para Ânion Superóxido (0,02% NBT e PMA 1 µg/mL em PBS), deixando incubar por uma hora a 37°C sob 5% de CO₂. Centrifugou-se a placa por 5 minutos a 1500 rpm, lavou-se os poços com PBS, centrifugou-se novamente e, após aspiração, adicionou-se metanol 50% e incubou-se a placa por 10 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada 5 minutos a 1500 rpm e todo o seu conteúdo foi aspirado para que houvesse evaporação do metanol durante incubação sem a tampa da placa. Por fim, 120 µl de KOH 2 M e 140 µl de DMSO foram adicionados à placa e incubados por 30 minutos para posterior leitura em leitor de microplacas a 550 nm. Os dados são apresentados em porcentagem, considerando o meio como 100% de atividade.

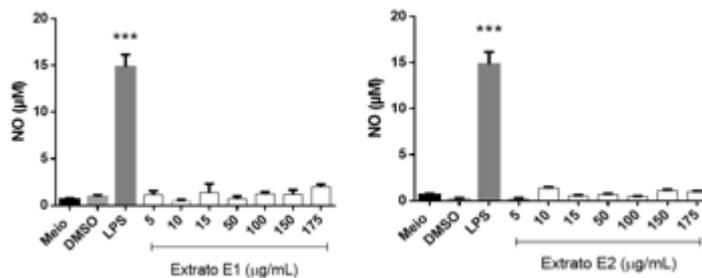
Avaliação do efeito dos compostos sobre a capacidade fagocítica dos macrófagos: Após as 48h de incubação, adicionaram-se aos poços 100 µl de uma solução contendo zimosan (2,3x10⁸ partículas/ml), DMSO e vermelho neutro, com consecutiva incubação por 30 minutos. Em seguida, efetuou-se a lavagem dos poços e adição de 100 µl de fixador de Baker (Acetato de Cálcio, NaCl, Formaldeído e água). Após 30 minutos de incubação, adicionou-se solução de extração (Etanol, Ácido Acético e água) e então, efetuou-se a leitura em leitor de microplacas a 550 nm. Os dados são apresentados em porcentagem, considerando o meio como 100% de atividade.

Avaliação do efeito dos compostos sobre produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂): Após as 48h de incubação, adicionaram-se nos poços 100 µl de uma solução contendo glicose, vermelho de fenol, e peroxidase. PMA (Phorbol Myristate Acetate) foi adicionado nos poços contendo somente meio e após, incubou-se por 30 minutos em ambiente escuro. Em seguida, adicionaram-se 10 µl de NaOH para cessar a reação. Efetuou-se a leitura em leitor de microplacas a 595 nm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

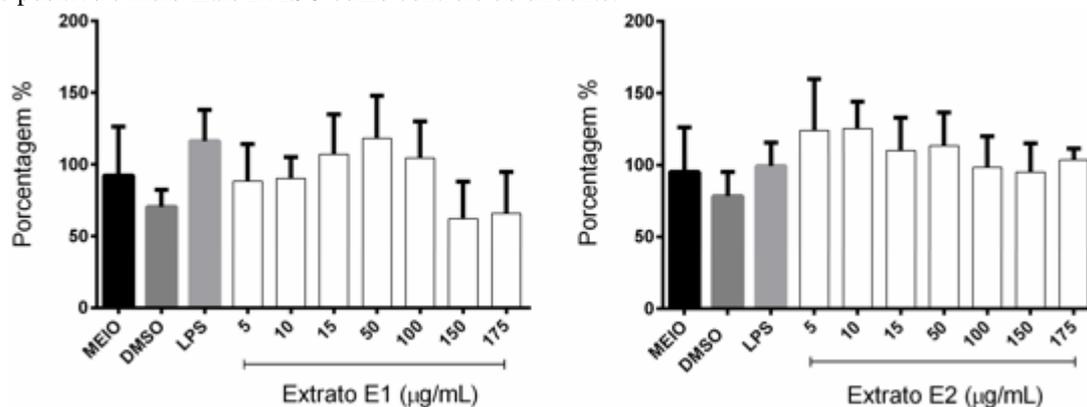
Avaliação da produção de NO: Conforme demonstrado na figura 1, pode-se verificar que, tanto o extrato 1 quanto o extrato 2 de *Eugenia pyriformis*, em qualquer uma das concentrações analisadas, não foram capazes de estimular a produção de quantidades significativas de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais.

Figura 1 - Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos submetidos aos extratos obtidos por CO₂ supercrítico (E1) e extração assistida por ultrassom (E2) de folhas de *Eugenia pyriformis*. O meio foi utilizado como controle negativo, LPS como controle positivo e meio mais DMSO foi utilizado como controle do diluente. *** indica diferença significativa para o meio.



Avaliação da produção de superóxidos: Verifica-se através da figura 2 que não houve diferenças significativas entre os tratamentos com E1 ou E2 e o meio. Como todos os tratamentos e controles foram incubados na presença de PMA (um indutor dos superóxidos), esperava-se uma produção desse radical, porém, uma ação sinérgica com os extratos não foi demonstrada, uma vez que os níveis de superóxido foram semelhantes entre as células tratadas com os extratos ou não. A diminuição na produção observada nas maiores concentrações de E1 (150 e 175 µg/mL) pode ser explicada pela toxicidade exercida por essas concentrações em ensaio de viabilidade celular realizado previamente.

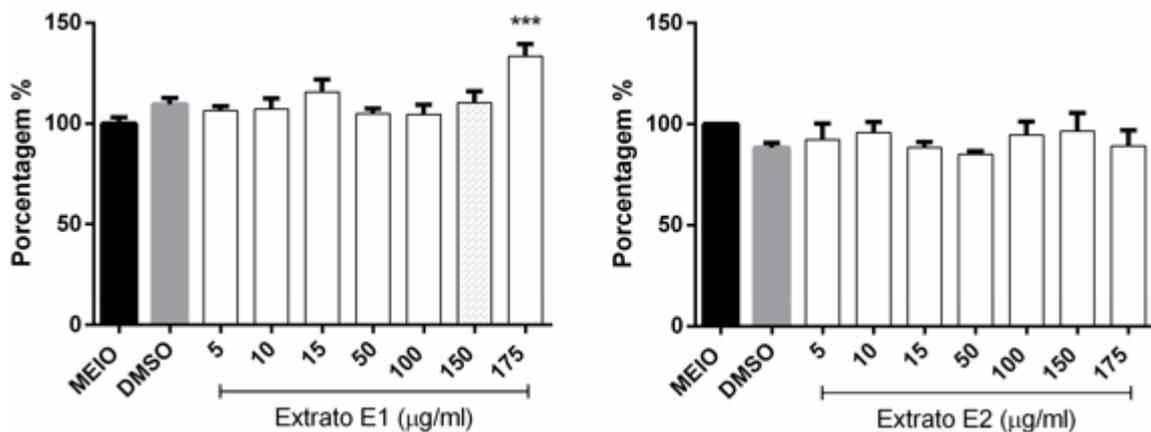
Figura 2 - Produção de superóxidos por macrófagos submetidos ao extrato obtido por CO₂ supercrítico (E1) e extração assistida por ultrassom (E2) de folhas de *Eugenia pyriformis*. O meio foi utilizado como controle negativo, LPS como controle positivo e meio mais DMSO como controle do diluente.



Avaliação do efeito dos compostos sobre a capacidade fagocítica dos macrófagos: Os macrófagos são as principais células as quais as *Leishmanias* se replicam, e, para garantirem sua sobrevivência dentro do sistema imune desenvolveram seus próprios mecanismos de modulação da resposta fagocitária, sendo capazes dessa forma de corromper a resposta do sistema inato de defesa do hospedeiro (Kira *et al*, 2001; Barbosa *et al*, 2018).

Através da figura 3 verifica-se que apenas na concentração de 175 µg/ml em E1 houve um estímulo significativo da fagocitose pelos macrófagos tratados. Nas outras concentrações e em E2, verificam-se resultados com valores próximos em relação ao meio, dessa forma, não se pode concluir que houve um estímulo para a fagocitose.

Figura 3 - Efeito dos compostos sobre a capacidade fagocítica dos macrófagos submetidos ao extrato obtido por CO₂ supercrítico (E1) e extração assistida por ultrassom (E2) de *Eugenia pyriformis*. O meio foi utilizado como controle negativo e meio mais DMSO foi utilizado como controle do diluente. *** indica diferença significativa para o meio.



Avaliação do efeito dos compostos sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂): O peróxido de hidrogênio é um composto altamente reativo produzido pelas células, que possui capacidade oxidativa e, portanto, que é capaz de induzir danos em numerosos constituintes celulares (Wittmann *et al.*, 2012).

Nos ensaios realizados verificou-se que em nenhuma das concentrações, em qualquer um dos extratos, houve a produção significativa de peróxido de hidrogênio.

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que dentre os ensaios realizados, apenas o da avaliação da capacidade fagocítica, na concentração mais elevada do extrato (175 µg/ml) obtido por CO₂ supercrítico (E1), foi capaz de promover um estímulo satisfatório. Faz-se necessário a repetição de alguns dos outros ensaios para se ter resultados mais conclusivos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Fundação Araucária pela bolsa concedida e à Unioeste pela estrutura para realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- Barbosa, F. M. C. et al. (2018). Extracellular Vesicles Released by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Promote Disease Progression and Induce the Production of Different Cytokines in Macrophages and B-1 Cells. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Blanco, V. R. & Nascimento-Júnior, N. M. (2017). Leishmaniose: aspectos Gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. *Rev. Virtual de Química* 9, 861-876.
- Cavalcante, I. J. M., Vale, M. R. (2014). Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (calazar) no Ceará no período de 2007 a 2011. *Rev. Bras. Epidemiol* 17, 911-924.
- Freitas e Azevedo, R. C., Marcili, A. (2020). Alterações cutâneas secundárias à infecção por *Leishmania* sp.: revisão de literatura. *Braz. J. of Develop.* 6, 19328-19346.
- Kira, R. et al. (2001) Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *The Journal of Immunology* 167, 893-901.
- Rossi, M., Fasel, N., How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *International Immunology* 30, 103-11.
- Stieven, A. C. et al. (2009). Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. *Eclética Química Journal* 34, 7-16.
- Wittmann, C. et al. (2012) Hydrogen Peroxide in Inflammation: Messenger, Guide, and Assassin. *Advances in Hematology*, 1-6.