INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-ARGINASE DE *Euphorbia umbellata*

Bruna Nunes da Silva (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Flávio Luís Beltrame (Orientador), e-mail: flaviobeltra@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Ciências Farmacêuticas/Ciências Biológicas e da Saúde.

Palavras-chave: arginase, disfunção endotelial, óxido nítrico.

Área: farmacologia; Subárea: Farmacologia Geral.

Resumo

A disfunção endotelial é caracterizada pelo prejuízo de resposta vasodilatadora, sendo a baixa biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) uma das causas. Nesse sentido, a competição pelo substrato entre as enzimas arginase e óxido nítrico sintase (NOS) contribui para a baixa na produção de NO. Sabendo-se que as plantas constituem vasto arsenal terapêutico para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, buscou-se avaliar o efeito anti-arginase do extrato polar das cascas de *Euphorbia umbellata.* Tal avaliação foi feita em estudos *in vivo* e *ex vivo* em ratos com hiperglicemia induzida. Como resultado, observou que os animais que receberam o tratamento com o extrato polar da planta apresentaram um aumento da vasodilatação e uma diminuição da creatinina dosada do soro em comparação com os animais controle. Por fim, sugere-se que a inibição da arginase pelos extratos de *E. umbellata* em ratos hiperglicêmicos tenha contribuído para a melhora da função endotelial, mostrada pelos resultados obtidos.

Introdução

Doenças como hipertensão e diabetes caracterizam-se pelo desenvolvimento da disfunção endotelial, representada pela diminuição da disponibilidade de óxido nítrico (NO) nas células endoteliais. O NO é responsável por promover a vasodilatação, por aumentar o diâmetro dos vasos e, consequentemente, aumentar o fluxo sanguíneo (HUYNH et al., 2009).

No processo de disfunção do endotélio, a redução da biodisponibilidade do NO ocorre por um mecanismo de competição pelo substrato *L*-arginina pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) e arginase. Assim, quando se aumenta a atividade da arginase, há uma diminuição da produção do NO (ORTIZ-VILCHIS et al., 2017). Por outro lado, um estudo relatou que o extrato obtido de cacau (*Theobroma cacao)* contendo flavonoides, especificamente (–)-epicatequina (EPI), demonstrou inibição da arginse e favorecimento dos níveis de NO, resultando em um efeito vasodilatador pronunciado (SCHNORR et al., 2008).

Nesse sentido, sabe-se que muitas plantas que possuem usos etnofarmacológicos para tratamento de inúmeras doenças não têm suas propriedades ainda estudadas. A *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns é uma espécie conhecida popularmente como janaúba ou leitosinha, apresenta inúmeras atividades biológicas descritas e é utilizada na medicina popular, de modo geral, como anti-inflamatória, devido a grande presença de compostos fenólicos (MINOZZO et al., 2016).

De acordo com a literatura, substâncias pertencentes a esta classe apresentam atividade de inibição da enzima arginase, por isso, buscou-se neste

trabalho avaliar a ação anti-arginase do extrato polar das cascas de *Euphorbia umbellata*, objetivando demonstrar um possível efeito desse extrato na melhora de quadros que envolvem disfunção endotelial.

Materiais e Métodos.

1) Obtenção das frações de *Euphorbia umbellata:* as cascas da planta foram coletadas na região de Ponta Grossa, Paraná, Brasil, secas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para obtenção do extrato bruto, uma quantidade de cascas foi minimamente triturada e posta em equipamento de *Soxhlet*. A fração metanólica, usada neste estudo, foi obtida pelo mesmo método extrativo a partir do extrato bruto; em seguida procedeu-se a concentração pelo processo de rotaevaporação, liofilização e armazenamento ± 4°C até o momento do uso.
2) Animais: ratos *Wistar* machos (180-250 g, 11-13 semanas) foram obtidos do Núcleo de Estudos Avançados da Vida (NAEVI) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os testes foram projetados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal do Conselho Brasileiro de Experimentos de Animais. O protocolo experimental (nº10922/2016) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UEPG.
3) Estudo *in vivo*: os animais foram randomizados em 3 grupos experimentais (n= 4-9). Os animais foram mantidos em jejum prévio de 12 horas e a hiperglicemia foi induzida por duas doses consecutivas de estreptozocina injetadas na região intraperitoneal. Na sequência, os ratos foram aleatoriamente divididos para receber os tratamentos (por gavagem): fração metanólica, salina (sham) e o veículo (dimetilsulfóxido 20% em salina), como o controle negativo. Os tratamentos foram administrados durante 14 dias, uma vez ao dia. Ao final das 2 semanas de estudo, os animais foram heparinizados e anestesiados (quetamina e xilazina) para retirada da aorta, realização do teste de reatividade vascular e retirada do sangue para as determinações bioquímicas.
4) Reatividade vascular: a artéria torácica descendente foi cuidadosamente retirada, limpa e cortada em aneis de aproximadamente 3-5 mm. Para cada animal, 2 aneis de aorta foram suspensos em banho de órgão, submetidos a uma tensão basal de 1 g. Na sequência, adicionou-se 1µM de fenilefrina (PHE) para contração durante 10-15 minutos, logo, mais 10 µM de acetilcolina (ACH) para relaxamento por mais 10-15 minutos e novas lavagens foram feitas (30 minutos) para estabilização do anel. O próximo passo foi à contração dos aneis de aorta até 70% do efeito máximo observado na curva da PHE. Por último, contraiu-se novamente com PHE até 70% e estabeleceu-se a curva de relaxamento com nitroprussiato de sódio (NPS, 1 nM – 30 µM). Todos os dados da tensão formada sobre os aneis pelo uso dos agentes vasoativos foram registrados por transdutores de força acoplados ao sistema Powerlab 4/30 com interface no *software* LabChart8.
5) Medidas plasmáticas: foi utilizado equipamento de análises bioquímicas disponível no laboratório escola da UEPG , com kits de ensaio da marca Wiener para dosagem de ureia e creatinina no soro dos animais.
6) Análise estatística: os dados foram e expressos como média ± erro padrão da média. Utilizou-se o *software* GraphPad Prism 5.1 para análise e representações gráficas, sendo que foram consideradas significantes medidas com diferenças superiores a $p < 0,05$, conforme teste de variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Bonferroni.

Resultados e Discussão

Na realização do preparado do extrato bruto da casca de *Euphorbia umbellata* obteve-se um rendimento de 38,52%. A partir desse extrato bruto, foi obtida a fração metanólica, com um rendimento de 15,92%. Além disso, na padronização da dose de estreptozocina para a indução da hiperglicemia foram utilizados cinco animais que receberam por via intraperitoneal injeções de 1 mL de estreptozocina em dose única ou dois dias consecutivos. Feitas as aplicações, ao terceiro dia foi confirmada a glicemia por glicosímetro digital.

Após a etapa descrita acima, obtiveram-se os seguintes resultados:

Animal	Peso (g)	Dose de STZ (mg/Kg)	Via	Concentração final	Volume a administrar
1	265	50 + 50	IP	13,25 mg	1 mL (salina)
2	300	50 + 50	IP	15 mg	1 mL (salina)
3	298	100	IP	29,8 mg	1 mL (salina)
4	298	150	IP	44,7 mg	1 mL (salina)
5	318	200	IP	63,6 mg	1 mL (salina)

Legenda: STZ: estreptozocina, IP: intraperitoneal

Tabela 1. Dados coletados do modelo de indução de hiperglicemia *in vivo* por STZ (ip)

Ao confirmar os valores no terceiro dia, verificou-se que os animais 1 e 2 apresentaram glicemia capilar de 297 e 318 mg/dL respectivamente, confirmando dessa maneira uma hiperglicemia (> 250 mg/dL). Entretanto, os demais animais apresentaram a glicemia capilar <250 mg/dL. Após 10 dias da primeira aplicação da dose, os animais 1 e 2 apresentaram glicemia de 455 e 443 mg/dL respectivamente, estabelecendo dessa forma a padronização da dose (50 mg/Kg em dois dias consecutivos) para a indução da hiperglicemia.

No experimento com aneis da aorta, quando expostos à acetilcolina (ACH) (Figura 1), aqueles provenientes dos animais que receberam como tratamento o veículo não obtiveram uma resposta eficaz no relaxamento, pois, devido à disfunção endotelial as células apresentam prejuízo no seu funcionamento e não produzem NO de maneira satisfatória para ocorrer a vasodilatação. No entanto, os animais que receberam como tratamento a fração metanólica, bem como o grupo sham, mostraram que houve relaxamento quando em contato com a ACH.

Esses resultados indicam que, dentre os mecanismos propostos para o efeito observado, houve uma inibição da arginase pela fração metanólica extraída das cascas da *Euphorbia umbellata* e com isso um melhora da vasodilatação em razão da maior biodisponibilidade de NO ao endotélio vascular. Ao entrarem em contato com o nitroprussiato de sódio (NPS) (Figura 1), todos os grupos obtiveram uma resposta positiva frente à vasodilatação, pois, o NPS atua de forma direta como doador de NO, isto é, resposta independente do endotélio, validando, dessa maneira, os resultados alcançados.

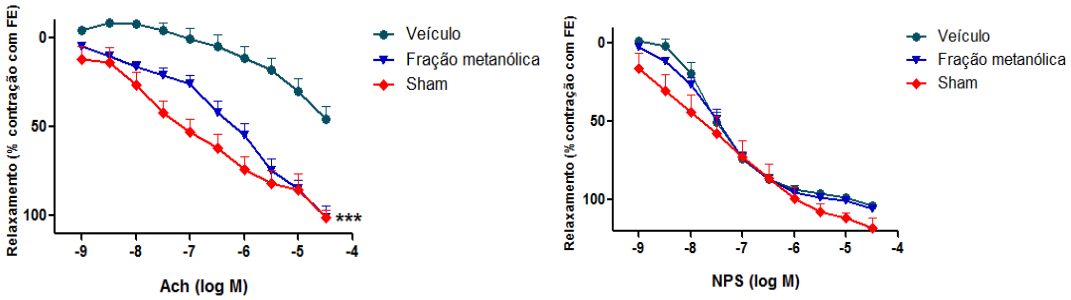


Figura 1. Resposta de aneis da aorta em contato com a acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS). *** significa p < 0,001 em relação ao veículo (dimetilssulfóxido: salina estéril 1:5) , ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni.

Nas medidas plasmáticas, não se observou diferença sobre os valores de ureia entre os grupos de tratamento. Contudo, houve diminuição da creatinina no grupo tratado com a fração metanólica (Figura 3). Supõe-se, com isso, haver maior oferta da L-arginina à enzima NOS para a síntese de NO, uma vez esse substrato também é usado para a síntese de creatinina.

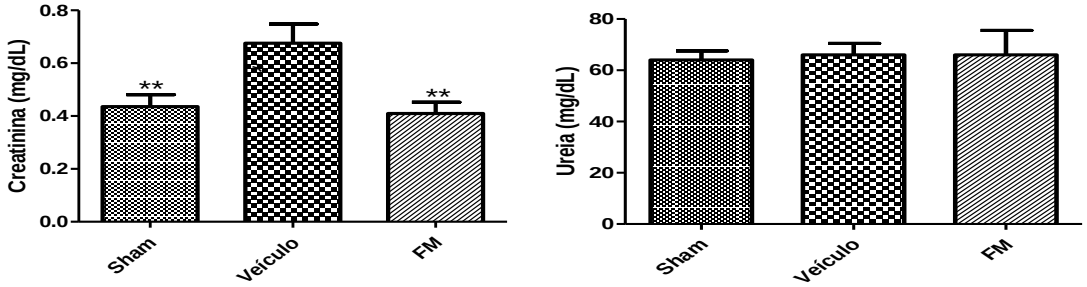


Figura 3: Dosagem de ureia e creatinina plasmáticas de animais tratados durante 14 dias, 30 mg/Kg (n=5 por grupo). ** significa p < 0,01 em relação ao grupo controle. ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni.

Conclusões

Conclui-se que o grupo de animais hiperglicêmicos que recebeu tratamento com a fração metanólica das cascas de *Euphorbia umbellata* apresentou melhor resposta de vasodilatação, bem como diminuição da creatinina quando comparado ao grupo controle negativo, sugerindo-se, assim, uma possível inibição da arginase e consequente aumento de NO para manutenção da resposta vasodilatadora.

Agradecimentos

À UEPG pelo financiamento da bolsa, aos conhecimentos passados a mim pelo Professor Flávio e ao Bruno Minozzo, pela ajuda e co-orientação no decorrer de todo o projeto e pela oportunidade de estar inserida ao um grupo de pesquisa.

Referências

HUYNH, N.N., et al., 2009. The vascular effects of different arginase inhibitors in rat isolated aorta and mesenteric arteries. Brit J Pharmacol. 156, 84-93.

MINOZZO, B.R.M. et al., 2016. Anti-ulcer mechanisms of polyphenol extract of Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae). J Ethnopharmacol. 191, 29-40.

ORTIZ-VILCHIS, Pilar et al., 2018. The cardioprotective effects of (-)-Epicatechin are mediated through arginase activity inhibition in a murine model of ischemia/reperfusion. Eur J Pharmacol, v. 818, p.335-342.

SCHNORR, O., et al., 2008. Cocoa flavonols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo. Arch Biochem Biophys. 476, 211-215.