

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR MUSCARÍNICO M1 NA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA EPIISOPILOTURINA

¹ Danyela Maria Leal Rocha; ² Ana Clara Coelho da Costa; ² Fernando Mesquita de Sousa de Lima;
² Tino Marcos Lino da Silva; ³ Rafael da Silva Prudêncio; ⁴ Viviane Pinheiro Alves de Almeida.

¹ Graduanda em Biomedicina pela Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAR;
² Graduanda (o) em Biomedicina pela Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAR;
³ Mestrando em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPG-BIOTEC; ⁴ Doutoranda em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO.

Área temática: Biomedicina e Inovações em Pesquisas

Modalidade: Comunicação Oral

E-mail do autor: danyelaleal22@gmail.com

RESUMO

INTRODUÇÃO: As Doenças Inflamatórias Intestinais são um grupo de distúrbios inflamatórios crônicos que acometem o trato gastrointestinal. Neste grupo insere-se a Retocolite Ulcerativa, caracterizada pela inflamação da mucosa do cólon e reto. Suas abordagens terapêuticas objetivam reduzir danos ocasionados pelo processo inflamatório e seus sintomas, entretanto, essas terapêuticas possuem diversos efeitos adversos sendo necessário buscar medicamentos com menos efeitos secundários. A espécie *Pilocarpus microphyllus* do Jaborandi, é uma planta que possui diversos alcaloides com propriedades farmacológicas, entre elas a pilocarpina, um alcaloide colinérgico. Entre os resíduos industriais gerados pela sua produção encontra-se a epiisopiloturina (EPI), um alcaloide imidazólico com propriedades antiparasitárias e anti-inflamatórias. O receptor muscarínico M1 possui ação anti-inflamatória intestinal quando estimulado, e assim levantou-se a hipótese que a epiisopiloturina, estruturalmente semelhante ao agonista muscarínico pilocarpina, tenha seu mecanismo de ação por essa via. **OBJETIVO:** Avaliar a participação do receptor muscarínico M1 na atividade anti-inflamatória da epiisopiloturina através de parâmetros inflamatórios morfológicos. **MÉTODOS:** Para a avaliação da atividade anti-inflamatória da EPI, os animais receberam a substância nas doses 0,01, 0,1 e 1,0 (mg/kg, i.p.), 17 horas após a indução da retocolite ulcerativa. A avaliação do receptor muscarínico M1 na reposta anti-inflamatória da EPI foi testada pelo bloqueio da ação de epiisopiloturina com o antagonista seletivo pirenzepina (10 mg/kg, i.p.). Foram utilizados parâmetros morfológicos (peso úmido, escores macroscópicos e microscópicos de lesão) na avaliação da atividade anti-inflamatória. **RESULTADOS:** A EPI na dose 0,1 mg/kg foi capaz de reverter os parâmetros morfológicos de inflamação, diminuindo o peso úmido e as lesões macro e micro do tecido. Os animais que receberam epiisopiloturina juntamente com o antagonista pirenzepina apresentaram possível bloqueio dos efeitos anti-inflamatórios. **CONCLUSÃO:** Infere-se que a ação anti-inflamatória da epiisopiloturina se dá possivelmente pelo receptor muscarínico M1, pois, após o bloqueio deste receptor, a epiisopiloturina teve seu efeito anti-inflamatório bloqueado.

Palavras-chave: Retocolite Ulcerativa; Receptor Muscarínico M1; Epiisopiloturina.

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) compõem um grupo de doenças crônicas que acometem o trato gastrointestinal, caracterizadas principalmente por altas taxas de recidivas e remissões. Dentre este grupo, apresentam-se a Retocolite Ulcerativa (RCU), que é uma doença crônica caracterizado pela recorrente inflamação da mucosa colônica e retal (MOLODECKY, 2012).

O tratamento farmacológico da RCU ocasiona importantes efeitos adversos, sendo necessário a busca por medicamentos com um menor percentual de efeitos secundários, como acontece em substâncias fitoterápicas (SILVA et al., 2019). A espécie *Pilocarpus microphyllus* do Jaborandi, é uma planta que possui diversos alcaloides com propriedades farmacológicas, entre elas a pilocarpina, um alcaloide colinérgico que possui como um de seus resíduos industriais a epiisopiloturina (EPI), um alcaloide imidazólico com propriedades antiparasitárias e anti-inflamatórias VERAS et al., 2013).

O receptor muscarínico M1 foi avaliado como uma via antiinflamatória intestinal em camundongos com RCU induzida por ácido acético, e sua estimulação reduziu importantes parâmetros inflamatórios. Com Isso, buscou-se avaliar a ação anti-inflamatória da EPI através desse receptor (MAGALHÃES et al., 2021).

2 OBJETIVO

Avaliar a participação do receptor muscarínico M1 na atividade anti-inflamatória da epiisopiloturina através de parâmetros inflamatórios morfológicos.

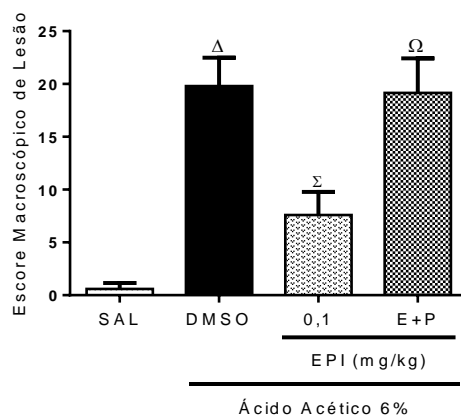
3 MÉTODOS

Para os ensaios foram utilizados 6 camundongos Swiss fêmeas (25–30g) divididos em 4 grupos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12/12h) controlados, tratados conforme o Guia de Cuidado em Uso de Animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Além disso, no presente projeto a eutanásia foi realizada seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), resolução normativa nº 37 de 15/02/2018. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) UFPI (protocolo nº 464/18).

Após a anestesia, os camundongos foram submetidos à indução da RCU experimental no grupo controle positivo com Ácido Acético (AA) (6%, 200 μ L 38 intracólon) e AA + Dimetilsulfóxido (DMSO) a 2%. Para o tratamento foi administrado a melhor dose de EPI (0,1 mg/kg i.p.) e feito o bloqueio de sua ação pelo antagonista seletivo do receptor M1, pirenzepina (10 mg/kg, i.p.), seguindo estudo de Magalhães et al. (2021). Após 18 horas da indução da retocolite os animais foram eutanasiados pelo método descrito por Guazelli et al. (2013). Foi realizada uma incisão mediana com abertura da cavidade peritoneal, retirada uma porção de 5 cm do cólon e aberta longitudinalmente, lavada com soro fisiológico e distendida sobre uma superfície plana para avaliação dos escores macroscópicos de lesão de acordo com a técnica de Morris (1989) e dos escores microscópicos seguindo a técnica de Appleyard e Wallace (1995). Para a determinação do peso úmido os segmentos do cólon foram pesados em balança analítica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 1. EPI diminui os escores macroscópicos de lesão do cólon de camundongos através do receptor M1.

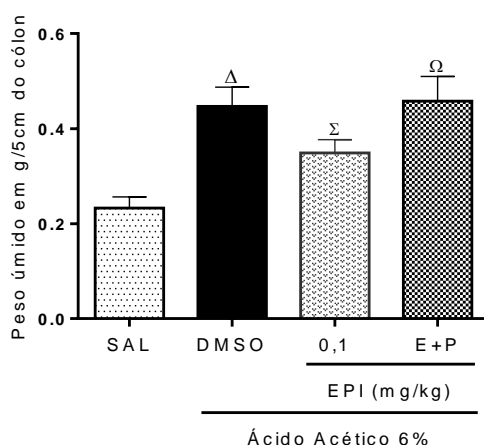


Legenda: SAL, salina; DMSO, dimetilsulfóxido; EPI, epiisopiloturina; E+P, epiisopiloturina + pirenzepina. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo.

Conforme mostrado na Figura 1, o grupo acometido com retocolite ulcerativa induzida por ácido acético 6% que recebeu apenas DMSO (2%, i.p.) ($19,80 \pm 1,200$), apresentou aumento das lesões macroscópicas no cólon de camundongos, apresentando focos de inflamação com extensão da lesão, hiperemia e ulceração, principalmente quando comparado com o grupo que recebeu apenas solução intracolônica de salina ($0,600 \pm 0,244$). O grupo tratado apenas com EPI na dose 0,1 mg/kg

(i.p.) apresentou diminuição significativa dos escores macroscópicos de lesão, demonstrando assim sua ação anti-inflamatória quando comparado com o grupo DMSO. Contudo, após a aplicação EPI + Pirenzepina, notou-se o bloqueio da ação anti-inflamatória da EPI, demonstrado pelas lesões macroscópicas no tecido do cólon, com a presença de foco inflamatório, hiperemia e ulceração. Neste contexto, sugere-se que a Pirenzepina bloqueia os efeitos anti-inflamatórios da Epiisopiloturina.

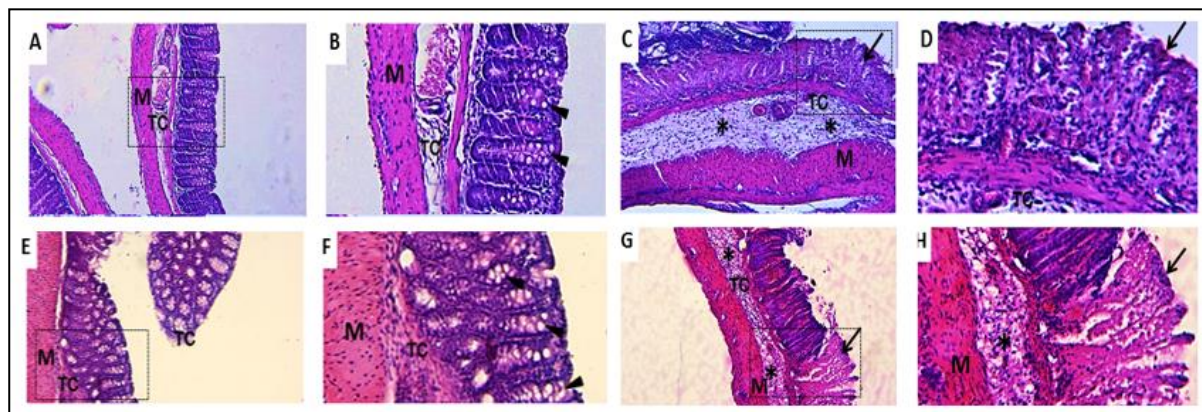
Figura 2. Epiisopiloturina diminui o peso úmido do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.



Legenda: SAL, salina; DMSO, dimetilsulfóxido; EPI, epiisopiloturina; E+P, epiisopiloturina + pirenzepina. Os resultados estatísticos são expressos como média ± erro de 6 animais por grupo.

Como mostrado na Figura 2, houve um aumento significativo do peso úmido do tecido do cólon de animais do grupo DMSO (0.4466 ± 0.01818 g/5cm), quando relacionado ao grupo SAL (0.2327 ± 0.009577 g/5cm) via intracólon. O grupo EPI (0.3488 ± 0.01133 g/5cm) obteve uma diminuição do peso úmido quando comparado com o grupo DMSO. A aplicação concomitante de Epiisopiloturina + Pirenzepina (0.4579 ± 0.01831 g/5cm) ocasionou no bloqueio da ação anti-inflamatória da EPI caracterizado pelo peso úmido do cólon dos animais elevado quando comparado ao grupo EPI e grupo SAL. Este resultado sugere que o antagonista do receptor muscarínico M1 bloqueia os efeitos anti-inflamatórios da Epiisopiloturina aumentando o peso úmido no cólon de camundongos.

Figura 3. EPI diminui os escores microscópicos do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.



Legenda: Cortes histológicos dos cólons de camundongos corados com hematoxilina e eosina (HE). Grupo SAL (A, B); grupo AA + DMSO (C, D); grupo AA + EPI (E e F); grupo AA + EPI + Pirenzepina (G, H).

Tabela 1. EPI diminui os escores microscópicos de lesão no cólon de animais através do receptor muscarínico M1.

Grupos	Escore Microscópico					Escore total
	Perda da arquitetura da mucosa	Infiltração celular	Espessamento da camada muscular	Formação de abscesso em cripta	Ausência de células caliciformes	
Salina	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0
AA + DMSO	3 (2-3) #	3 (2-3) #	3 (1-3) #	1 (1-1) #	1 (1-1) #	11 #
AA + EPI 0,1	1 (0-1) *	1 (1-2) *	1 (0-1) *	0 (0-1)	1 (0-1)	4 *
AA + EPI 0,1 + PIR	3 (2-3) #	3 (2-3) #	2 (1-2) #	1 (0-1) #	1 (0-1) #	10 #

Legenda: Escore para avaliação histopatológica expresso em mediana (valores: mínimo – máximo). #P < 0.05 em relação ao grupo salina; *P < 0.05 em relação grupo AA + DMSO.

Os achados histológicos demonstraram que os animais do grupo controle positivo, que recebeu apenas DMSO apresentou o valor total máximo, com aumento na perda da arquitetura, aumento do infiltrado celular, espessamento da camada muscular, aumento na formação de abscesso em cripta e ausência de células caliciformes. O aumento dessa pontuação foi significativo quando comparado ao grupo salina que apresentou pontuação mínima nos escores totais para todos esses parâmetros. Os animais que foram tratados com EPI demonstraram baixa pontuação com preservação dos aspectos microscópicos, ao contrário dos animais que receberam tratamento concomitante de EPI + pirenzepina que apresentou características inflamatórias semelhantes aos

observados no grupo DMSO, com perda da arquitetura da mucosa, elevado infiltrado celular, e espessamento da camada muscular, formação de abscesso em criptas e depleção de células caliciformes podendo-se observar o bloqueio total da ação anti-inflamatória da EPI.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios sugere-se que o receptor muscarínico M1 participa da resposta anti-inflamatória da EPI durante o curso da RCU em camundongos, uma vez que, a EPI foi eficaz na redução de parâmetros morfológicos de inflamação como peso úmido do cólon, escores macroscópicos e microscópicos de lesão. No entanto, quando administrada conjuntamente com o antagonista do receptor muscarínico M1, Pirenzepina, houve um possível bloqueio dos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da EPI.

REFERÊNCIAS

APPLEYARD, C. B.; WALLACE, J. L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **American Journal of Physiology**, v. 269, p. 119-25, 1995.

GUAZELLI, C. F. S.; FATTORI, V.; COLOMBO, B. B.; GEORGETTI, S. R. Quercetin Loaded Microcapsules Ameliorate Experimental Colitis in Mice by Anti-inflammatory and Antioxidant Mechanisms. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 200–208, 2013.

MAGALHÃES, D. A. et al. McN-A-343, a muscarinic agonist, reduces inflammation and oxidative stress in an experimental model of ulcerative colitis. **Life Sciences**, v. 272, p. 119194, 2021.

MOLODECKY, N. A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 46-54, 2012.

MORRIS, G. P.; BECK P. L.; HERRIDGE M. S.; DEPEW W. T.; SZEWCZUK M. R.; WALLACE J. L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**. v. 96, p. 795-803, 1989.

SILVA, M. M. et al. O USO CRÔNICO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃOESTEROIDAIIS E SEUS EFEITOS ADVERSOS. **Cadernos da Medicina - UNIFESO**, v. 2, n. 2, 2019.

VERAS. L. M. C. et al. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1-11, jun. 2013.