

P072 Investigação da atividade da fração 1AERT obtida de *Uncaria tomentosa* (unha de gato) sobre a modulação da via clássica do sistema complemento humano

R.M. Lenzi^a, F. Bovo^{a,b}, G. Bertol^c, C. Gaya^a, L.H. Campestrini^a, S.F. Zawadzki-Baggio^a, F.R. Stevan-Hancke^{a,d}, J.B.B. Maurer^a

^a NUPPLAMED, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, 81531-900, Curitiba, PR, Brasil. ^b Departamento de Farmácia, UNICENTRO, 85040-080, Guarapuava, PR, Brasil. ^c Laboratório Herbarium, 83403-500, Colombo, PR, Brasil. ^d Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Positivo, 81280-330, Curitiba, PR, Brasil.

Uncaria tomentosa (Willd.) D.C. (unha-de-gato, "cat's claw", "unha de gato") é uma planta medicinal da Amazônia empregada no tratamento de várias doenças em função de suas potentes propriedades anti-inflamatórias e imunestimulantes.⁽¹⁾ O sistema complemento (SC) é composto por um conjunto de proteínas séricas que têm por função proteger o organismo de agentes agressores, participando da imunidade inata e adaptativa.^(2,3) A ativação excessiva de complemento está envolvida na patogênese de muitas doenças auto-imunes e doenças inflamatórias, portanto, a inibição do SC é uma estratégia no tratamento dessas doenças.^(3,4) Por outro lado, a ativação do complemento pode atuar benéficamente em termos de imunestimulação não específica, para manter o processo de cicatrização e na terapêutica antitumoral.^(3,4) Desta forma, dependendo do enfoque ou da situação clínica específica tanto a inibição como a ativação do SC podem ser interessantes. O objetivo deste estudo foi analisar quimicamente e investigar a atividade da fração aquosa (1AERT) obtida a partir de cápsulas fitoterápicas de *U. tomentosa* sobre a modulação da via clássica do sistema complemento humano. A fração 1AERT foi caracterizada pela análise de teores de fenóis totais,⁽⁵⁾ carboidratos,⁽⁶⁾ proteínas⁽⁷⁾ e alcalóides⁽⁸⁾ e também da composição monossacarídica.^(9,10) O ensaio de difusão radial em gel de agarose na presença de reagente de Yariv (b-Glucosil)₃⁽¹¹⁾ foi realizado para quantificação de arabinogalactana-proteínas (AGPs). No presente estudo utilizou-se uma modificação do teste de fixação do complemento convencional, o qual foi realizado com e sem incubação prévia.⁽¹²⁾ Desta forma, a partir da análise e comparação dos resultados obtidos (curvas de hemólise induzida pelo complemento e valores de ICH₅₀) foi possível inferir se a fração em estudo atua como inibidor ou ativador do SC. O valor de ICH₅₀ corresponde à concentração final da fração-teste (µg/ml) capaz de reduzir a atividade hemolítica da mistura de soro humano (MHS) em 50%. Quanto menor o ICH₅₀, mais potente é o composto em inibir a hemólise.⁽¹³⁾ A heparina bovina foi utilizada como controle positivo de inibição do SC.⁽¹²⁾ Em microtubos foram adicionados 20 µl da solução-teste em concentrações finais de 1,6 µg.ml⁻¹ a 833 µg.ml⁻¹ (triplicata para cada concentração) e 50 µl de MHS diluído em tampão HEPES/Ca²⁺ 10 mM (pH 7,4); e após 0 e 30 min de incubação prévia a 37°C, 50 µl da suspensão de eritrócitos de carneiro (a 1,2%) sensibilizados com hemolisina foram adicionados. Os tubos foram incubados por 30 min a 37°C, centrifugados (5 min, a 1440 x g) e o sobrenadante lido a 405 nm. A percentagem de inibição da hemólise considerada como 100% de hemólise foi obtida quando os 20 µl de solução-teste foram substituídos por 20 µl de tampão HEPES/Ca²⁺.⁽¹²⁾ As análises químicas da fração 1AERT demonstraram a presença de compostos fenólicos (42%), de componentes glicídicos (28%), de proteínas (<10%), bem como a ausência de alcalóides (<0,01%). Entre os componentes glicídicos, 23% correspondem às AGPs e 26% aos açúcares ácidos. Em relação aos açúcares neutros, esta fração apresenta-se constituída de Rha (8%), Ara (11%), Gal (23%) e Glc (26%). Com relação à capacidade de modulação do SC, a curva de inibição da hemólise apresentada pela heparina foi semelhante nos dois ensaios, com e sem pré-incubação, com ICH₅₀ de 25 e 30 µg.ml⁻¹, respectivamente. Este resultado confirma que a heparina atua como inibidor da via clássica do SC. Entretanto, as curvas apresentadas pela fração 1AERT foram diferentes nos dois ensaios, com e sem pré-incubação. No ensaio sem pré-incubação, o ICH₅₀ foi de 180 µg.ml⁻¹, valor maior do que o encontrado no ensaio com pré-incubação, o qual foi de 32 µg.ml⁻¹. Portanto, a fração 1AERT reduziu a hemólise induzida pelo complemento com mais eficácia somente após a pré-incubação, o que indica que essa fração, através da via clássica, é capaz de ativar o SC, e não de inibi-lo, como a heparina. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a fração 1AERT pode ser classificada como modificadora da resposta biológica, e que a presença de AGPs nesta fração poderia contribuir com os efeitos imunestimulantes apresentados por essa planta.

Agradecimentos: Ao CNPq, PROEX-CAPES, PRONEX-Carboidratos, and UGF-SETI/PR pelo apoio financeiro.

Referências: 1. Alonso, J. (2007) Tratados de fitofármacos y nutraceuticos. Corpus Editorial y Distribuidora Argentina. 2. Abbas, A.K. (2003) Imunologia celular e molecular. Revinter. 3. Hoebe, K. et al. (2004) Nat Immunol, 5, 971-974. 4. Dutta, R.; Das, N. (2011) Toxicology, 285, 126-132. 5. Morais, S.A.L. et al. (2009) Química Nova, 32, 327-331. 6. Fox, J.D., Robyt, J.F. (1991) Anal. Biochem 195, 93-96. 7. Braford, M.M. (1976) Anal Biochem, 72, 248-254. 8. Bertol, G. (2010) Dissertação – PPG/Ciências Farmacêuticas/JFPR. 9. Albersheim, P. (1967) Carbohydr Res 5, 340-345. 10. Filizetti-Cozzi, T.M.C.C., Carpita, N.C. (1991) Anal Biochem 197, 157-160. 11. Van-Holst, G., Clarke, A.E. (1985) Anal Biochem 148, 446-450. 12. Alban, S. et al. (2002) Planta Med 12, 1118-1124. 13. Yamada, H. et al. (1985) Carbohydr Res 144, 101.