

**Avaliação histomorfométrica do rim de camundongos albinos swiss
expostos a extratos de *parmotrema concurrens* (líquen)**

**Histomorphometric evaluation of the kidneys of albino swiss mice exposed
to extracts of *parmotrema concurrens* (lichen)**

DOI:10.34119/bjhrv5n6-031

Recebimento dos originais: 10/10/2022

Aceitação para publicação: 08/11/2022

Maria Aparecida da Conceição de Lira

Doutora em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Endereço: Cidade Universitária, s/n, CEP: 50670-420, Recife - Pernambuco, Brasil

E-mail: liramacbio@gmail.com

Marllyn Marques da Silva

Doutora em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900,

Recife - Pernambuco, Brasil

E-mail: marllynmsilva@yahoo.com.br

Luana Cristina da Silva

Bacharel em Enfermagem

Instituição: Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Endereço: Bela Vista, s/n, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão - Pernambuco, Brasil

E-mail: luana.cristina@ufpe.br

Luana Carla de Lima Silva

Bacharel em Enfermagem

Instituição: Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Endereço: Bela Vista, s/n, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão - Pernambuco, Brasil

E-mail: luanacarla515@gmail.com

Carla Janylle dos Santos Silva

Bacharel em Enfermagem

Instituição: Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Endereço: Bela Vista, s/n, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão - Pernambuco, Brasil

E-mail: carlajanylle@hotmail.com

Emerson Peter da Silva Falcão

Doutor em Ciências Biológicas

Instituição: Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Endereço: Bela Vista, s/n, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão - Pernambuco, Brasil

E-mail: emerson.sfalcao@ufpe.br

Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior

Doutor em Estomatopatologia

Instituição: Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Endereço: Bela Vista, s/n, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão - Pernambuco, Brasil

E-mail: famanajas@yahoo.com.br

Sebastião José de Melo

Doutor em Ciências Farmacêuticas

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Endereço: Cidade Universitária, s/n, CEP: 50670-420, Recife - Pernambuco, Brasil

E-mail: melosebastiao@yahoo.com.br

RESUMO

Líquens são seres originados a partir da associação simbiótica entre um fungo e uma alga e/ou cianobactéria, com características morfológicas peculiares que os distinguem das formas que lhes deram origem. A espécie *Parmotrema concurrens* é caracterizada pela combinação de ácidos liquênicos, já descritos, como importantes agentes biológicos para fins terapêuticos. O presente trabalho propôs avaliar a histomorfometria renal de camundongos Albinos swiss tratados com extratos de *P. concurrens*. Os extratos orgânicos foram obtidos através do método de extração por esgotamento em aparelho de Soxhlet, seguindo a série eluotrópica dos solventes, éter etílico, clorofórmio e acetona. Para o estudo *in vivo* foram utilizados camundongos Albinos swiss. A Toxicidade renal foi avaliada segundo a metodologia recomendada pela Organization for Economic Cooperation and Development. O teste de toxicidade constituiu na administração da dose de 2000 mg.kg⁻¹ via oral dos extratos orgânicos nos animais experimentais. Os resultados não mostraram diferenças significativas na morfologia e no peso dos órgãos dos animais tratados em relação ao grupo controle. A análise histomorfométrica dos rins demonstrou que não houve diferença entre as áreas glomerular e capsular dos animais tratados em relação ao grupo controle. Porém, foi verificado que os extratos clorofórmico e acetônico apresentaram uma diminuição significativa da área do espaço capsular, 526±246,38 e 591,13±339,99 µm², respectivamente, quando comparados ao grupo controle, 716,35±317,26 µm². Contudo, é pertinente que produtos naturais obtidos a partir de extratos de *P. concurrens* sejam utilizados como uma molécula promissora, visto que não houve toxicidade ao rim e por possuírem um amplo potencial farmacológico.

Palavras-chave: fungos liquênicos, parmeliaceae, toxicidade.

ABSTRACT

Lichens are beings originated from the symbiotic association between a fungus and an alga and/or cyanobacterium, with peculiar morphological characteristics that distinguish them from the forms that gave rise to them. The species *Parmotrema concurrens* is characterized by the combination of lichenic acids, already described, as important biological agents for therapeutic purposes. The present work proposed to evaluate the renal histomorphometry of Albinos swiss mice treated with extracts of *P. concurrens*. The organic extracts were obtained through the method of extraction by exhaustion in a Soxhlet apparatus, following the eluotropic series of solvents, ethyl ether, chloroform and acetone. For the *in vivo* study, Albinos swiss mice were used. Renal toxicity was evaluated according to the methodology recommended by the Organization for Economic Cooperation and Development. The toxicity test consisted of the oral administration of a dose of 2000 mg.kg⁻¹ of organic extracts in experimental animals. The results did not show significant differences in the morphology and weight of the organs of the treated animals in relation to the control group. The histomorphometric analysis of the kidneys

showed that there was no difference between the glomerular and capsular areas of the treated animals in relation to the control group. However, it was found that the chloroform and acetone extracts showed a significant decrease in the capsular space area, 526 ± 246.38 and $591.13 \pm 339.99 \mu\text{m}^2$, respectively, when compared to the control group, $716.35 \pm 317.26 \mu\text{m}^2$. However, it is pertinent that natural products obtained from extracts of *P. concurrens* are used as a promising molecule, since there was no toxicity to the kidney and because they have a wide pharmacological potential.

Keywords: lichen fungi, parmeliaceae, toxicity.

1 INTRODUÇÃO

O tecido renal é muito suscetível aos danos causados por agentes estranhos presentes na corrente sanguínea, uma vez que suas células têm a finalidade de reabsorção e concentração de solutos, fazendo com que compostos metabolizados interajam com suas organelas, podendo modificar o caminho de sinalização celular e, até mesmo causando lesões teciduais (BARNETT e CUMMINGS, 2019).

Alterações nas estruturas renais podem desencadear expansão renal, restringindo e distorcendo capilares glomerulares, diminuindo a superfície de filtração do capilar. Com isso, os danos podem obstruir o glomérulo, com consequente redução da função renal (ARAÚJO et al., 2019).

Por produzir diferentes classes de metabólitos, os líquens são considerados organismos promissores na busca de agentes terapêuticos no combate a diversas doenças. Na literatura é possível verificar uma grande variedade de estudos *in vitro* e *in vivo* que comprovam efeitos satisfatórios das substâncias liquênicas (RANKOVIĆ e KOSANIĆ, 2015; HONG et al., 2018; KHADER et al., 2018; SOLÁROVÁ et al., 2020).

Os fungos liquenizados ou líquens são definidos como organismos simbióticos, compostos pela associação entre um fungo (micobionte) e uma alga ou cianobactéria (fotobionte) (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996; XAVIER-FILHO et al., 2006). Biologicamente, são interpretados como um organismo, mas taxonomicamente são vistos como uma forma de vida de fungos ascomicetos; formadores de líquen ou "micobionte", sendo classificado como o parceiro simbiótico dominante (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2008).

Contudo, a necessidade na busca de novos agentes terapêuticos, provindos de meios naturais, é de extrema importância para a cura de doenças, promovendo menores, e/ou sem, efeitos adversos ao organismo, principalmente aos órgãos mais sensíveis a agentes estranhos, como o tecido renal. Como visto, moléculas bioativas derivadas de líquens apresentam-se com um forte potencial biológico e inovador para a produção de novos análogos potencialmente

ativos. Portanto, esse estudo consiste em uma adição valiosa para o conhecimento da espécie líquênica e sua contribuição farmacológica.

2 MATERIAIS E MÉTODO

2.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

A espécie líquênica *P. concurrens* foi coletada no município de Taquaritinga do Norte - Pernambucano, região Nordeste do Brasil, apresentando altitude de 785 m e coordenadas de latitude 07° 54' 11" S e longitude de 36° 02' 39" O. As amostras foram identificadas pela Dr^a Maria de Lourdes Lacerda Buriel, do Laboratório de Geografia Ambiental do Departamento de Ciências Geográficas – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); uma exsicata do material *in natura* foi depositada no Herbário UFP - Geraldo Mariz, do Departamento de Botânica, da UFPE sob registros UFP84254.

2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS

Foram utilizados 60g do material *in natura*, triturado em Moinho MA 630/1. A extração foi realizada por esgotamento, em aparelho de soxhlet, seguindo a série eluotrópica dos solventes, éter etílico, clorofórmio e acetona. Foram utilizados 200 mL de cada solvente à temperatura de ebulição. Em seguida os solventes foram evaporados em rotaevaporador à temperatura de 40 °C.

3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS

3.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA – CCD

Os ensaios em CCD foram realizados através da metodologia descrita por Culberson (1972). Os extratos foram diluídos em seus respectivos solventes de extração a 0,01 mg.mL⁻¹, e aplicados 10 µL da solução em cromatoplasmas de sílica Gel Merck F254nm+366. Foi utilizado como sistema de eluição a solução tolueno:dioxano:ácido acético (180:45:5, v/v). As bandas foram observadas sob luz UV (254 e 366 nm), reveladas com ácido sulfúrico a 10 % (etanol) e, posterior aquecimento a 100 °C por 5 min. Os constituintes dos extratos foram identificados por meio da comparação dos valores de R_f e, reação de coloração das manchas, com os padrões utilizados ácido salazínico e atranorina.

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos Albinos Swiss (*Mus musculus*) machos (35-45g), com idade de 60 dias, mantidos em gaiolas de polipropileno com grades inoxidáveis e maravalha como cobertura, à temperatura de 22 ± 3 °C, com ciclo claro-escuro de 12 h, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos ao jejum de 8 horas antes da execução do experimento. Os protocolos de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (Nº 23076.012019/2018.58), de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de experimentação Animal (CONCEA) e pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

3.3 ESTUDO DA TOXICIDADE RENAL

A Toxicidade renal foi avaliada segundo recomendação da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD - 425, 2008). O teste constituiu na administração da dose máxima de 2000 mg.kg⁻¹, por via oral, dos extratos orgânicos nos camundongos. Foram utilizados 5 animais por grupo. O grupo controle negativo recebeu apenas solução salina + tween 80 a 5%. Após a administração, os animais foram observados continuamente nas primeiras duas horas e depois a cada 24 horas, durante 14 dias, para a verificação de qualquer alteração comportamental ou nas atividades fisiológicas e mortalidade. No décimo quarto dia, após a administração dos extratos, os animais foram eutanasiados por overdose de solução de anestésicos cetamina (1,25 g/kg) e xilazina (0,62 g/kg), via intraperitoneal. Os rins dos animais foram retirados para análise histológica.

3.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os rins foram dissecados e acondicionados em solução de formol a 10% tamponada, permanecendo nesta solução por um período de 48 h. Em seguida, as amostras foram desidratadas em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizadas por xilol, impregnadas e incluídas em parafina líquida.

Os cortes teciduais (4 µm) foram corados com Hematoxilina-Eosina (H&E) e as imagens histológicas foram capturadas com câmera digital Moticam 2300, acoplada ao microscópio óptico, sob foco fixo, utilizando as objetivas de 40x para os tecidos, sendo observados 20 campos por lâmina. As fotomicrografias foram avaliadas usando o software ImageJ® versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). As estruturas renais foram avaliadas através da mensuração da área do glomérulo, corpúsculo e espaço capsular.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação histomorfométrica foi realizada através de um teste de normalidade utilizando o Teste Smirnov Kolmogorov. Dessa forma, um teste não paramétrico (Mann-Whitney U) calculado pelo SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) foi utilizado para analisar esses dados. Os dados são expressos como média \pm DP, com valores de $p < 0,05$ comparado com o controle considerado significativo.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os extratos liquênicos obtidos da espécie *P. concurrens*, obtiveram bons rendimentos. Os resultados analisados por Cromatografia em Camada Delgada, evidenciaram a presença da atranorina nos extratos etéreo e clorofórmico e, do ácido salazínico no extrato acetônico. Tais dados estão de acordo com os relatos descritos por Benatti e Marcelli (2009) e Spielmann e Marcelli (2008), que constataram a presença do ácido salazínico e da atranorina em *P. concurrens*.

Testes de toxicidade ajudam a fornecer informações importantes relativas ao efeito tóxico celular e sistêmico, extremamente fundamentais ao desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas (ARAÚJO et al., 2019).

Durante os quatorze dias de observação dos animais tratados, não foram observados sinais clínicos de toxicidade. Ressalta-se ainda que não houve mortalidade durante o período de observação.

Os rins dos animais foram pesados e verificou-se que não houve diferença significativa dos grupos que receberam os extratos liquênico e os animais do controle negativo (Tabela 1).

Tabela 1. Peso dos rins dos camundongos expostos aos extratos de *Parmotrema concurrens*

Grupos	Rim (g)
Controle Negativo	0,69 \pm 0,05
Extrato Etéreo	0,69 \pm 0,07
Extrato Clorofórmico	0,68 \pm 0,05
Extrato Acetônico	0,69 \pm 0,02

Dados expressos em média \pm desvio padrão. (N=5); $p < 0,05$ v.s controle negativo.

A análise microscópica renal demonstrou que não houve diferença entre as áreas glomerular e capsular dos extratos de *P. concurrens* em relação ao grupo controle.

No entanto, o espaço capsular renal dos animais expostos aos extratos clorofórmico e acetônico, apresentaram uma diminuição significativa em comparação ao grupo controle negativo (Tabela 2). Não foi evidenciado necrose tecidual e hemorragias. As células dos túbulos contorcidos apresentaram-se organizadas e a arquitetura glomerular preservada (Figura 1).

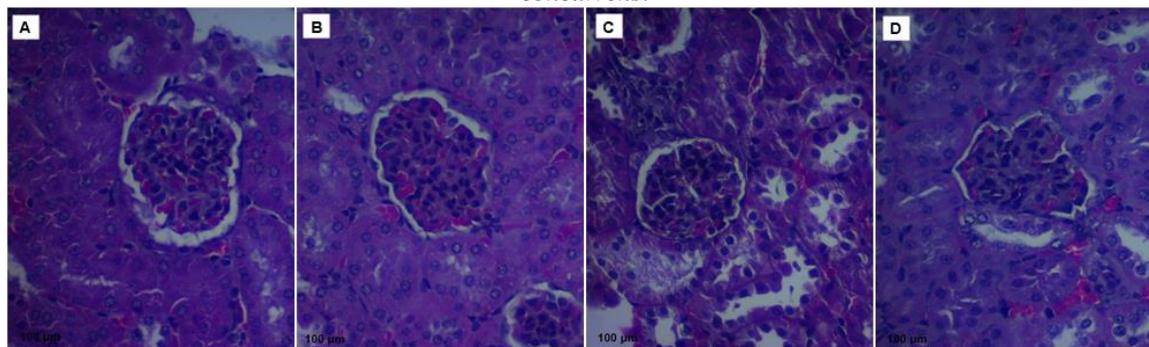
A a quimioterapia gera altos danos ao organismo por se tratar de uma terapia sistêmica que, além de afetar as células cancerígenas atuam também nas células saudáveis (CHAGAS et al., 2022). Um vasto número de compostos ativos já comercializados, possuem grandes potenciais nefrotóxicos, sendo importante o monitoramento da função do tecido renal em pacientes que fazem a utilização dos mesmos (MELLO et al., 2021). Por ser um órgão muito sensível a substâncias estranhas ao organismo, faz-se necessário a prescrição de fármacos que não causem danos ao tecido.

Tabela 2. Análise Histomorfométrica do rim de camundongos expostos aos extratos de *P. concurrents*

Grupos	Rim (μm^2)		
	Glomérulo	Corpúsculo	Espaço capsular
Controle Negativo	2711,61±567,78	3427,97±702,26	716,35±317,26
Extrato Etéreo	2663,28±508,20	3371,46±714,58	708,18±353,99
Extrato Clorofórmico	2853,75±596,22	3379,76±680,90	526±246,38***
Extrato Acetônico	27,89,96±575,97	3381,09±752,30	591,13±339,99***

Teste Mann-Whitney. Dados expressos em média \pm desvio padrão. (N=5); ***p<0,001 v.s CN. CN= controle negativo; EE= extrato etéreo; EC= extrato clorofórmico e EA= extrato acetônico.

Figura 1. Fotomicrografia representativa do tecido renal dos camundongos expostos aos extratos de *Parmotrema concurrents*.



(A)= Controle negativo; (B)= Extrato etéreo; (C)= Extrato clorofórmico; (D)= Extrato acetônico; Coloração H&E (ampliação: 100X).

5 CONCLUSÃO

Contudo, é pertinente que os extratos obtidos da espécie *Parmotrema concurrents*, possuam possíveis propriedades biológicas e além do mais, não geram toxicidade no tecido renal, um dos principais órgãos sensíveis a agente estranho ao corpo. Todavia, faz-se necessário estudos mais aprofundados, com outras metodologias, para garantir essa afirmação.

AGRADECIMENTO

A Dr^a Maria de Lourdes Lacerda Buriel, pela identificação taxonômica das amostras;

O apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
e da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Propesq / UFPE

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, H.D.A. et al. Usnic acid potassium salt: Evaluation of the acute toxicity and antinociceptive effect in murine model. **Molecules**, v. 24, p. 1–17, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24112042>
- BARNETT, L.M.A., CUMMINGS, B.S. Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Toxicity. **Seminars in Nephrology**, v. 39, p. 141–151, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2018.12.004>
- BENATTI, M.N., MARCELLI, M.P. Espécies de Parmotrema (Parmeliaceae, Ascomycota) do litoral centro-sul do estado de São Paulo, Brasil. I. Grupos químicos girofórico e lecanórico. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 1013-1026, 2009. doi:10.1590/S0102-33062009000400011
- CHAGAS, J.M.A. et al. A utilização da terapia oncológica integrativa como complemento ao tratamento convencional para o osteossarcoma. **Brazilian Journal of Health Review**, v.5, n.1, p.2711-2719, 2022. DOI:10.34119/bjhrv5n1-242
- CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thinlayer-chromatographic method. **Journal of Chromatography**, v. 72, p. 113-125, 1972.
- HALE-JR., M. E. **The Biology of Lichens**. 3. ed. London: Edward Arnold Pub., 1983.
- HONG, J. M. et al. Anti-Cancer Activity of Lobaric Acid and Lobarstin Extracted from the Antarctic Lichen *Stereocaulon alpinum*. **Molecules**, v. 23, n. 658, p. 1-10, 2018.
- KHADER, S. Z. A. et al. Larvicidal Potential of Selected Indigenous Lichens against Three Mosquito Species- *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi*. **Chinese Herbal Medicines**, p. 1-7, 2018.
- MELLO, P.A. et al. Nefrotoxicidade e alterações de exames laboratoriais por fármacos: revisão da literatura. **Revista de Medicina**, v. 100, n. 2, p.152-161, 2021.
- NASH III, T. H. **Lichen Biology**. Cambridge, USA: Cambridge University Press. 1996, p. 303.
- OECD – 425 Organization for Economic Cooperation and Development, 2008. Guideline for the Testig of Chemicals, Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP).
- RANKOVIC', B.; KOSANIC', M. Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites. **Lichen Secondary Metabolites**. **Springer**, p. 1-26, 2015.
- SOLÁROVÁ, Z. et al. Anticancer potential of lichens' secondary metabolites. **Biomolecules**, n. 10, v. 87, p. 1-33, 2020.
- SPIELMANN, A. A.; MARCELLI, M. P. *Parmeliaceae* (Ascomycota liquenizados) nos barrancos e peraus da encosta da Serra Geral, Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brasil. II. Gêneros *Canoparmelia*, *Hypotrachyna*, *Myelochroa*, *Parmelinopsis* e *Relicina*. **Iheringia**, v. 63, n. 2, p. 193-212, 2008.
- STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 188–200, 2008.
- XAVIER- FILHO, L. et al. **Biologia de Liquens**. 4. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural. 2006, p. 581-619.