EFEITOS DO BETA-CARIOFILENO SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTADO OXIDATIVO HEPÁTICO EM RATOS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE

Camila de Lima Barizão (PIBIC/FA), Ana Paula Ames Sibin, Anacharis Babeto Sá-Nakanishi, Jurandir Fernando Comar (orientador), e-mail: jfcomar@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá /Centro Ciências Biológicas/ Maringá, PR.

Área e subárea do CNPq/CAPES: Ciências Biológicas / Bioquímica

Palavras-chave: anti-inflamatório, estresse oxidativo, radicais livres.

Resumo:

O β-cariofileno é um sesquiterpeno natural com diversas propriedades terapêuticas, especialmente atividade anti-inflamatória. Este é o principal componente do óleo de copaíba, um dos principais fitoterápicos da Amazônia brasileira comercializado mundialmente. Recente estudo demonstrou que o óleo de copaíba (*Copaifera reticulata*) foi capaz de atenuar o estresse oxidativo hepático e inflamação em ratos com artrite por adjuvante. O presente trabalho avaliou os efeitos do tratamento de ratos com artrite por adjuvante com o β-cariofileno na dose de 430 mg Kg^{-1} sobre a inflamação e o estresse oxidativo hepático. O tratamento foi eficaz em reduzir o edema das patas, mas não as lesões secundárias sistêmicas devido à artrite. Em adição, o tratamento diminuiu o estresse oxidativo hepático. Desta forma, é possível que o β-cariofileno seja um composto útil para o tratamento da artrite reumatoide em humanos.

Introdução

O β-cariofileno é um sesquiterpeno natural que apresenta diversas propriedades terapêuticas, especialmente atividade anti-inflamatória. É o principal constituinte do óleo de copaíba, um dos mais importantes fitoterápicos da Amazônia brasileira, podendo atingir até 50% do seu conteúdo (VEIGA et al., 2007). O óleo de copaíba extraído da espécie *Copaifera reticulata* Ducke foi capaz de atenuar as manifestações inflamatórias articulares e sistêmicas em ratos com artrite induzida por adjuvante. Este último é um modelo experimental de inflamação crônica que compartilha muitas características da artrite reumatoide em humanos e, por isso, muito utilizado para avaliar a ação de compostos anti-inflamatórios e antirreumáticos (COMAR et al., 2013). O óleo de copaíba adicionalmente atenuou o estresse oxidativo hepático, que está bastante acentuado nos animais artríticos (CASTRO et al., 2017). Entretanto, estes efeitos foram associados com ação hepatotóxica do óleo, a qual foi atribuída principalmente ao seu conteúdo de compostos diterpênicos.

O *β*-cariofileno parece ser o responsável pela atividade anti-inflamatória do óleo de copaíba, entretanto, ainda é incerto se também é responsável pela atividade antioxidante. Em adição, como o *β*-cariofileno é o principal constituinte do óleo de copaíba, se comprovado seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, seria de interesse viabilizar a sua obtenção a partir do óleo de copaíba, que é a sua principal fonte natural, e investigar suas possíveis ações terapêuticas sobre a artrite reumatoide.

Considerando as propriedades do *β*-cariofileno acima descritas, o presente estudo tem como objetivo avaliar seus efeitos sobre a inflamação articular e sistêmica e o estresse oxidativo hepático em ratos com artrite induzida por adjuvante.

Materiais e métodos

A artrite foi induzida pela injeção do adjuvante completo de Freund (500 µg) na pata traseira esquerda de ratos da linhagem Holtzman com aproximadamente 60 dias de vida. Ratos com a mesma idade foram utilizados como controle. Os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos: CT, controles + óleo de milho; CTβ, controles + *β*-cariofileno 430 mg Kg^{-1}; AIA, artríticos + óleo de milho; AIAβ, artríticos + *β*-cariofileno; AIBU, artríticos + ibuprofeno 30 mg Kg^{-1}. O tratamento foi feito por via oral (gavagem) durante cinco dias antes da indução da artrite e por mais 18 dias. No 19º dia os animais foram eutanasiados. Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação - CEAE, da UEM (Parecer 007/2015).

O efeito anti-inflamatório do *β*-cariofileno foi avaliado por meio de alterações no volume das patas e escore de lesões secundárias à artrite. Para avaliar o efeito do β-cariofileno sobre o estado oxidativo, os fígados dos animais previamente anestesiados foram removidos, clampeados em nitrogênio líquido e homogeneizado em Van Potter-Elvhjem com 10 volumes de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4). O homogenato resultante foi centrifugado (11000g/15 min) e o sobrenadante utilizado para determinar os níveis de proteínas carboniladas, espécies reativas de oxigênio (ROS), glutationa reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase (SOD).

Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra os parâmetros anti-inflamatórios e de estresse oxidativo. O volume médio das patas antes da indução da artrite foi de 1,46 ± 0,1 ml. O aumento no volume (Δvol) das patas injetadas foram, respectivamente, 301%, 208% e 167% maiores que os iniciais, para os animais artrítico não tratados, tratados com β-cariofileno e tratados com ibuprofeno. Os volumes da pata injetada foram 31 e 43,7% menores nos animais artríticos tratados com β-cariofileno e o ibuprofeno, respectivamente (comparados aos artríticos não tratados). O aumento no volume (Δvol) das patas não injetadas foram, 161%, 70% e 82% maiores que os iniciais,

respectivamente, para os animais artrítico não tratados, tratados com β-cariofileno e tratados com ibuprofeno. No 18° dia, o incremento no volume da pata contralateral foi 56 e 49% menor, respectivamente, para os animais tratados com β-cariofileno e ibuprofeno (comparados aos artríticos não tratados). O tratamento com o β-cariofileno não foi efetivo em reduzir o escore das lesões secundárias à artrite, em contrapartida o tratamento com ibuprofeno reduziu em 20% este parâmetro.

Tabela1: Efeitos do β-cariofileno sobre os parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo hepático em ratos controles e artríticos.

Parâmetros	**Grupos**				
	CT	**CTβ**	**AIA**	**AIAβ**	**AIBU**
Δvol (mL) (pata esq.)	----	----	$4,4\pm0,3^{a}$	$3,0\pm0,3^{b}$	$2,4\pm0,1^{b}$
Δvol (mL) (pata dir.)	----	----	$2,4\pm0,2^{a}$	$1,0\pm0,3^{b}$	$1,2\pm0,2^{b}$
Escore artrítico	----	----	$5,0\pm0,5^{a}$	$4,8\pm0,2^{a}$	$4,0\pm0,4^{b}$
Prot. Carb. (nmol mg^{-1})	$5,4\pm0,3^{a}$	$5,6\pm0,4^{ab}$	$7,5\pm0,4^{c}$	$5,5\pm0,5^{a}$	$7,3\pm0,2^{bcd}$
ROS (nmol mg^{-1})	$0,9\pm0,1^{a}$	$0,9\pm0,1^{a}$	$1,8\pm0,1^{b}$	$1,3\pm0,1^{ac}$	$1,4\pm0,1^{c}$
GSH (nmol mg^{-1})	$12,9\pm0,6^{a}$	$9,6\pm0,3^{ac}$	$5,0\pm1,2^{b}$	$8,5\pm0,3^{c}$	$10,4\pm0,5^{ac}$
GSSG (nmol mg^{-1})	$1,4\pm0,1^{a}$	$1,5\pm0,3^{a}$	$2,5\pm0,2^{b}$	$1,7\pm0,1^{a}$	$3,2\pm0,3^{b}$
GSH/GSSG	$9,4\pm0,6^{a}$	$6,9\pm1,3^{b}$	$2,2\pm0,9^{c}$	$5,0\pm0,3^{bd}$	$3,3\pm0,5^{cd}$
Catalase (nmol min^{-1})	1116 ± 45^{a}	990 ± 140^{a}	251 ± 21^{b}	305 ± 37^{b}	250 ± 34^{b}
SOD (U mg^{-1})	$2,8\pm0,2^{a}$	$2,0\pm0,2^{a}$	$1,7\pm0,2^{b}$	$2,2\pm0,1^{ab}$	$2,2\pm0,2^{ab}$

O volume inicial das patas foi 1,46±0,1 ml. Δvol das patas =volume no dia 18 – volume inicial, expressados como mL. CT, controles; CTβ, controles tratados com β-Cariofileno 430 mg Kg^{-1} dia^{-1}; AIA, artrite induzida por adjuvante; AIAβ, artrite induzida por adjuvante tratada com β-Cariofileno 430 mg Kg^{-1} dia^{-1}; AIBU, artrite induzida por adjuvante tratada com ibuprofeno 35 mg Kg^{-1} dia^{-1}. Prot. Carb., proteínas carboniladas. Os dados representam a média ± erro padrão da média de 3-5 animais. Os valores com letras sobrescritas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Os níveis de proteínas carboniladas foram utilizados para avaliar o dano oxidativo hepático e foram 39% maiores nos ratos artríticos (comparados aos controles). O tratamento com o β-cariofileno foi capaz de reduzir os níveis de proteínas carboniladas aos mesmos que dos animais controle, por outro lado, o tratamento com ibuprofeno não melhorou este parâmetro. Os níveis de ROS foram 100% maiores nos ratos artríticos (comparados aos controles) e o tratamento com β-cariofileno e ibuprofeno

reduziram estes níveis, respectivamente, em 27 e 22%. O tratamento dos ratos controles com β-cariofileno não modificou os níveis de proteínas carboniladas e ROS no fígado. Os níveis de glutationa reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e atividade das enzimas catalase e SOD foram utilizados como parâmetros antioxidantes hepáticos. Os níveis de GSH foram 61% menor no fígado de ratos artríticos, o que causou uma diminuição de 76% na razão GSH/GSSG. O tratamento com o β-cariofileno foi capaz de elevar os níveis de GSH e a razão GSH/GSSG em 70 e 127% respectivamente. A atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase foram reduzidas pela inflamação (-77 e -39%, respectivamente), já os tratamentos não foram capazes de recuperar suas atividades.

Conclusões

Os resultados do presente trabalho mostraram que o tratamento com o β-cariofileno na concentração de 430 mg Kg^{-1} foi capaz de diminuir a inflamação articular, mas não a sistêmicas em ratos com artrite por adjuvante. O estresse oxidativo hepático foi também reduzido com o tratamento a perece ser devido ao aumento dos conteúdos de GSH. Estudos complementares são necessários, no entanto, para avaliar o mecanismo de ação e possível toxicidade do β-cariofileno. Em adição, os efeitos devem ser investigados utilizando menores doses β-cariofileno, de forma a viabilizar estudos clínicos para utilização como um auxiliar no tratamento da artrite reumatoide em humanos.

Agradecimentos

A Fundação Araucária pelo fomento e incentivo dados à pesquisa científica.

Referências

CASTRO-GHIZONI, C.V.; AMES, A.P.A.; LAMEIRA, O.A.; BERSANI-AMADO, C.A.; SÁ-NAKANISHI, A.B.; BRACHT, L.; NATALI, M.R.M.; PERALTA, R.M.; BRACHT A.; COMAR, J.F. Anti-inflammatory and antioxidant actions of copaiba oil are related to liver cell modifications in arthritic rats. **J Cell Biochem**, Maringá, v. n/a p. n/a, 2017.

COMAR, J.C.; DE SÁ-NAKANISHI, A.B.; DE OLIVEIRA, A.L.; WENDT, M.M.N.; BERSANI-AMADO, C.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; PERALTA, R.M.; BRACHT, A. Oxidative state ofthe liver of rats with adjuvant-induced arthritis. **Free Rad Biol Med,** Maringá, v.58, p. 144-153, 2013.

VEIGA JUNIOR, V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES M.G.; PINTO, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-a comparative study. **J Ethnopharmacol**, Manaus, v. 112, n. 2, p. 248-254, 2007.