

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS ISÔMEROS ANETOL E ESTRAGOL NO MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOZAN

Louise Ferreira Iunklaus (PIC/UEM), Renata Santana de Almeida (PIC/UEM), Francieli Maria de Souza Silva Comar (orientadora), e-mail: louseiunklaus@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá /Centro Ciências da Saúde / Maringá, PR.

Área e subárea do CNPq/CAPES: Farmacologia/Etnofarmacologia

Palavras-chave: migração de leucócitos, inflamação, óxido nítrico

Resumo:

O anetol (ANT) e o estragol (EST) são compostos monoterpenos, encontrados no óleo essencial de diversas plantas aromáticas. Diversas propriedades biológicas e farmacológicas já foram descritas para estes compostos. O ANT apresenta atividades antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatórias, anti-hipernociceptiva e imunomoduladora. O EST apresenta atividades sedativa, anticonvulsivante, antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos anti-inflamatórios do ANT e do EST no modelo de artrite induzida por zymosan. Especificamente, foi avaliada a migração celular na cavidade articular e os níveis de óxido nítrico no fluido articular. O ANT e o EST, nas doses de 250 e 500 mg/Kg, diminuíram o número de leucócitos totais e polimorfonucleares no lavado articular. O pré-tratamento com ANT e EST (250 e 500 mg/kg) reduziu os níveis de óxido nítrico no fluido articular e este processo mostrou uma forte correlação com o influxo celular. Em conjunto, os resultados mostraram que estes compostos apresentam atividade anti-inflamatória, conforme demonstrado pela redução na migração celular e produção de óxido nítrico.

Introdução

A artrite induzida por zymosan (AZy) é um modelo experimental muito utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório de diversos compostos devido ao seu baixo custo operacional e reprodução da lesão a curto prazo (RAMOS et al., 2001). Esse modelo apresenta parâmetros inflamatórios que são similares aos encontrados na artrite reumatoide, tais como, aumento da permeabilidade vascular, um acentuado influxo de células

polimorfonucleares (PMN) e sinovite progressiva com hiperplasia sinovial (ROCHA et al., 2003).

O ANT e o EST são monoterpenos, isômeros, encontrados no óleo essencial de plantas aromáticas. O ANT é um composto aromático amplamente utilizado na indústria alimentícia e estudos tem mostrado que este composto apresenta atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antihipercnocéptica, imunomodulatória e anti-inflamatória (ESTEVÃO-SILVA et al., 2013). O EST tem sido amplamente empregado na indústria de alimentos e bebidas como um condimento e como agente antimicrobiano para a conservação de alimentos. O EST apresenta atividade antiespasmódica sedativa, anticonvulsivante, miorelaxante, antioxidante, imunomoduladora e anti-inflamatória (SILVA-ALVES et al., 2013). Diante do exposto acima, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos anti-inflamatórios do ANT e do EST no modelo de AZy.

Materiais e métodos

A artrite foi induzida em camundongos BALB-c pela injeção intra-articular no joelho direito de 200 µg de zymosan. Animais controles foram submetidos apenas à administração de salina na articulação do joelho direito. Trinta minutos antes da injeção de zymosan, os camundongos foram tratados via oral com salina (veículo), ANT ou EST nas doses de 125, 250 ou 500 mg/kg. Após 6 horas da indução da artrite, os animais foram eutanasiados e o fluido sinovial foi coletado para a determinação do número de leucócitos totais e polimorfonucleares que migraram para a cavidade articular.

Para determinar as concentrações de óxido nítrico (NO) no local da inflamação, as articulações fêmuro-tibiais foram coletadas e trituradas em 500 µL de PBS/EDTA, centrifugadas e os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -70°C para posterior análise. Os níveis de nitrito foram determinados por meio da reação de Griess e utilizados como parâmetro para avaliar a produção de óxido nítrico. Resumidamente, 50 µL de sobrenadante isentos de células foram incubados com volume igual do reagente de Griess à temperatura ambiente durante 10 minutos. A absorbância foi medida num leitor de microplacas a 550nm. As concentrações de NO foram calculadas a partir de uma curva padrão preparada com nitrito de sódio e os resultados foram expressos como concentração de NO µM. Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação - CEAE, da UEM (Parecer 6319300317).

Resultados e Discussão

A Figura 1A mostra que o ANT nas doses de 250 e 500 mg/kg foi capaz de inibir o influxo de leucócitos totais, no lavado articular, quando comparado ao grupo zymosan (51,60 e 49,60%, respectivamente). Um efeito

similar foi observado com o EST, que reduziu, de forma dose-dependente, a migração de leucócitos nas doses de 250 e 500 mg/Kg (32,64 e 53,12%, respectivamente). A contagem diferencial mostrou que as células presentes na cavidade articular, após a injeção de zymosan, eram predominantemente leucócitos polimorfonucleares (PMN), principalmente neutrófilos (Figura 1B). O ANT e o EST (250 e 500 mg/Kg) reduziram significativamente o número de células PMN que migraram para a cavidade articular.

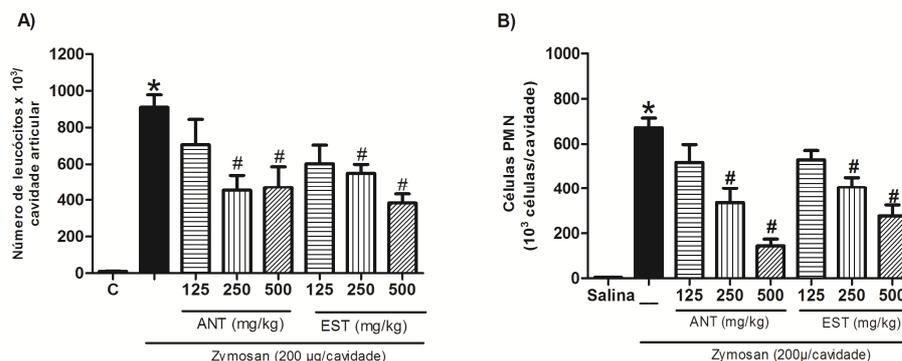


Figura 1. **Efeitos do ANT e do EST sobre a migração de leucócitos 6 horas após a injeção intra-articular de zymosan.** Leucócitos totais (A). Leucócitos PMN (B). Os dados foram expressos como a média \pm SEM. * $p < 0,05$, comparado com o veículo; # $p < 0,05$, comparado com o zymosan (ANOVA seguido pelo teste de Turkey).

Estudos demonstram que na artrite, os neutrófilos contribuem para a produção de NO, provavelmente devido ao aumento da expressão da óxido nítrico sintase (iNOS) nestas células. Já foi observado que a liberação de NO está associada ao pico de migração de neutrófilos na cavidade articular (Bezerra et al., 2004). A Figura 2 mostra que a injeção de zymosan na cavidade intra-articular aumentou significativamente os níveis de NO no líquido sinovial. Nos animais pré-tratados por via oral com ANT e EST (Figura 2) nas doses de 250 e 500 mg/kg, os níveis de NO foram significativamente reduzidos no líquido sinovial e este processo mostrou uma forte correlação com o influxo celular

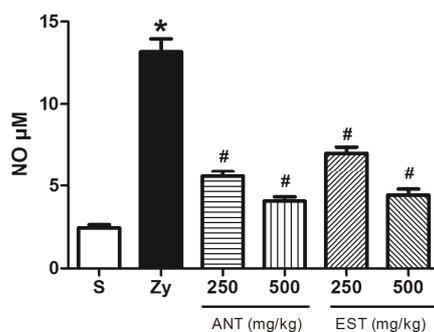


Figura 2. **Efeitos do ANT e do EST na produção de óxido nítrico, no fluido sinovial de animais submetidos a AZY.** Os dados foram expressos como a média \pm SEM. * $p < 0,05$,

comparado com o veículo; #p < 0:05, comparado com o zymosan (ANOVA seguido pelo teste de Turkey).

Conclusões

Os resultados encontrados no presente trabalho permitem concluir que o ANT e o EST apresentam atividade anti-inflamatória no modelo de AZY. Isto pode ser demonstrado pela inibição no recrutamento de leucócitos para a cavidade articular e redução da produção de óxido nítrico no fluido articular. Desta forma, estes compostos podem ser promissores medicamentos, de origem natural, utilizados em processos inflamatórios com excessiva migração de leucócitos.

Agradecimentos

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências

BEZERRA, M. M.; BRAIN, S. D.; GREENACRE, S.; JERÔNIMO, S. M. B.; MELO, L. B.; KEEBLE, J.; ROCHA, F. A. C. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **Br J Pharmacol**. 2004;141:172–82.

ESTEVÃO-SILVA, C. F.; KUMMER, R.; FACHINI-QUEIROZ, F. C.; GRESPAN, R.; NOGUEIRA DE MELO, G. A.; BARONI, S.; CUMAN, S. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Anethole and eugenol reduce *in vitro* and *in vivo* leukocyte migration induced by fMLP, LTB₄, and carrageenan. **Journal of Natural Medicines**, 2014.

RAMOS, A. M. O.; et al. Artrite induzida por zymosan em ratos: estudo histopatológico, histoquímico e bioquímico dos glicoconjugados da cartilagem articular. **Rev Bras. Reumatol**. 2001, 41(4).

ROCHA, F. A. C., et al. Efeitos dos inibidores da sintase do óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Rev. Bras. Reumatol**. 2003, 43(4): 206-217.

SILVA-ALVES, K. S.; FERREIRA-DA-SILVA, F. W.; PEIXOTO-NEVES, D.; VIANA-CARDOSO, K. V.; MOREIRA-JUNIOR, L.; OQUENDO, M. B.; OLIVEIRA-ABREU, K.; ALBUQUERQUE, A. A. C.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Estragole blocks neuronal excitability by direct inhibition of Na⁺ channels. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 2013, 46: 1056-1063.