

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ANETOL + IBUPROFENO NAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DA MEMBRANA SINOVIAL DE RATOS ARTRÍTICOS

Hugo Tokunaga Zerbinati (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Giovana Alves Santos, Franciele Queiroz Ames, Larissa Carla Lauer Schneider, Ciomar Aparecida Bersani Amado (Orientador), e-mail: cabamado@uem.br.

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

Área e subárea: Ciências Biológicas II, Farmacologia, Farmacologia geral

Palavras-chave: artrite induzida por adjuvante, anetol, ibuprofeno

Resumo:

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação anetol + ibuprofeno sobre as alterações da membrana sinovial da articulação femorotibial de ratos artríticos utilizando a técnica histológica de coloração HE. A artrite foi induzida pela injeção subcutânea de suspensão de adjuvante completo de Freund (ACF) na pata posterior esquerda. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: (I) animais normais; (II) animais artríticos; (III) animais artríticos tratados com anetol – AN 250 mg/kg; (IV) animais artríticos tratados com ibuprofeno – IB 35 mg/kg e (V) animais artríticos tratados com a associação AN 62,5 mg/kg + IB 8,75 mg/kg. O tratamento foi realizado por via oral, a partir do dia da indução da AIA e continuado por 21 dias. No final do período experimental, os animais foram anestesiados e sacrificados para a coleta da membrana sinovial da articulação das patas direita e esquerda. As amostras foram processadas e coradas pela técnica de HE para avaliações histológicas baseada em escore. Os animais artríticos (AIA) apresentaram um intenso infiltrado inflamatório, quando comparado aos animais normais. O tratamento dos animais artríticos com ibuprofeno e anetol, em monoterapia causou a diminuição do escore, ou seja, redução do infiltrado inflamatório na membrana sinovial. O tratamento com a associação AN + IB causou resultado similar. No conjunto, os dados forneceram evidências que a associação AN + IB, em doses mais baixas, apresentou potencial equivalente ao AN e IB em doses altas, para prevenir as alterações na membrana sinovial das articulações de ratos artríticos.

Introdução

O anetol (AN) [1-metoxi-4-benzeno-(1-propenil)] é um composto aromático encontrado naturalmente no anis (*Pimpinella anisum*), no anis-estrelado (*Illicium verum*) e no funcho/erva-doce (*Foeniculum vulgare*) que apresenta ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticarcinogênica, gastroprotetora, entre outras. Alguns estudos demonstram que o AN apresenta um efeito inibitório sobre a resposta inflamatória aguda (edema de pata, pleurisia) e crônica (artrite

induzida por adjuvante - AIA) (Domiciano et al., 2012; Ritter et al., 2017). Na AIA o tratamento com AN inibiu a resposta inflamatória, o número de leucócitos recrutados na cavidade sinovial e os danos articulares provocados pela doença, e a espessura da cartilagem articular e da membrana sinovial (Ritter et al., 2017). No entanto, estes efeitos foram obtidos quando altas doses do AN foram administradas e isto muitas vezes limita seu uso terapêutico porque pode aumentar a possibilidade de efeitos adversos.

A associação de fármacos é uma opção que se destaca quando se deseja reduzir as doses de um fármaco, sem causar redução dos efeitos terapêuticos. Portanto, a associação de um fármaco anti-inflamatório tradicional com um composto de origem natural tem como proposta obter um efeito terapêutico mais eficaz, minimizando os efeitos adversos (Atkinson et al., 2015). Já foi mostrado que a associação AN + IB apresenta efeito anti-inflamatório na AIA. No entanto, os efeitos da associação sobre as alterações da estrutura da membrana sinovial, induzidas pela própria doença, ainda não foram investigados. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação anetol + ibuprofeno sobre as alterações da membrana sinovial da articulação femorotibial de ratos artríticos utilizando a técnica histológica de coloração HE.

Animais e tratamento

Foram utilizados ratos da linhagem Holtzman, pesando entre 180 e 200g. Os animais foram mantidos sob temperatura de 22°C e em ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração à vontade. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (Protocolo CEUA nº 9804220716). A artrite foi induzida pela injeção subcutânea de suspensão de adjuvante completo de Freund (ACF) na pata posterior esquerda de ratos. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: (I) animais normais; (II) animais artríticos; (III) animais artríticos tratados com anetol – AN 250 mg/kg; (IV) animais artríticos tratados com ibuprofeno – IB 35 mg/kg e (V) animais artríticos tratados com a associação – AN 62,5 mg/kg + IB 8,75 mg/kg. O tratamento foi realizado por gavagem (via oral), a partir do dia da indução da AIA e continuado por 21 dias. No final do período experimental, os animais foram anestesiados e sacrificados para a coleta da membrana sinovial.

Análise Histológica da Membrana Sinovial

As articulações femorotibial direita e esquerda foram coletadas, fixadas em formalina 10% por 48h e descalcificadas em ácido etilenodiamino-tetra-acético 10% por 21 dias. Posteriormente foram desidratadas e embutidas em parafina. Cortes semi-seriados com 6 µm de espessura foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). A intensidade do infiltrado inflamatório na membrana sinovial das articulações, foi avaliado utilizando uma pontuação em escore, variando de 0 a 4 pontos, de acordo com a intensidade de células inflamatórias presentes no tecido: (0) ausência de infiltrado inflamatório – membrana sinovial normal; (1) infiltrado inflamatório leve, com poucas células inflamatórias – neutrófilos, macrófagos e linfócitos – distribuídos dispersamente pelo tecido; (2) infiltrado inflamatório moderado, maior número de células inflamatórias distribuídas difusamente e formando pequenos aglomerados; (3) infiltrado inflamatório intenso, membrana sinovial tomada por infiltrado

inflamatório; (4) infiltrado inflamatório muito intenso, membrana sinovial tomada por células inflamatórias e com espessamento evidente. Foram analisadas 3 medidas aleatórias por corte, em 9 cortes por animal, totalizando 45 medidas por grupo com a objetiva de 4X em microscópio óptico Olympus BX41 (Olympus, Tóquio, Japão).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados usando *t* teste ou análise da variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Os dados foram analisados usando o software Prism 5.0.

Resultados e Discussão

A avaliação histológica da membrana sinovial da articulação das patas direita e esquerda dos animais estão representadas nas Figura 1A e 1B. Como observado, no grupo de animais normais, os cortes corados por HE mostraram aspectos morfológicos conservados, com poucas células inflamatórias distribuídas dispersamente no tecido. Por outro lado, no grupo de animais artríticos (AIA) ocorreu graves alterações na membrana sinovial direita e esquerda, apresentando hiperplasia e hipertrofia das células sinoviais, com intenso infiltrado inflamatório. O tratamento dos animais artríticos com ibuprofeno (IB 35 mg/kg) e anetol (AN 250 mg/kg), em monoterapia causou a diminuição do escore, ou seja, redução do infiltrado inflamatório na membrana sinovial, mostrando poucas células dispersas no tecido. O tratamento com a associação AN + IB (AN 6,25 mg/kg + IB 35 mg/kg) causou resultado similar.

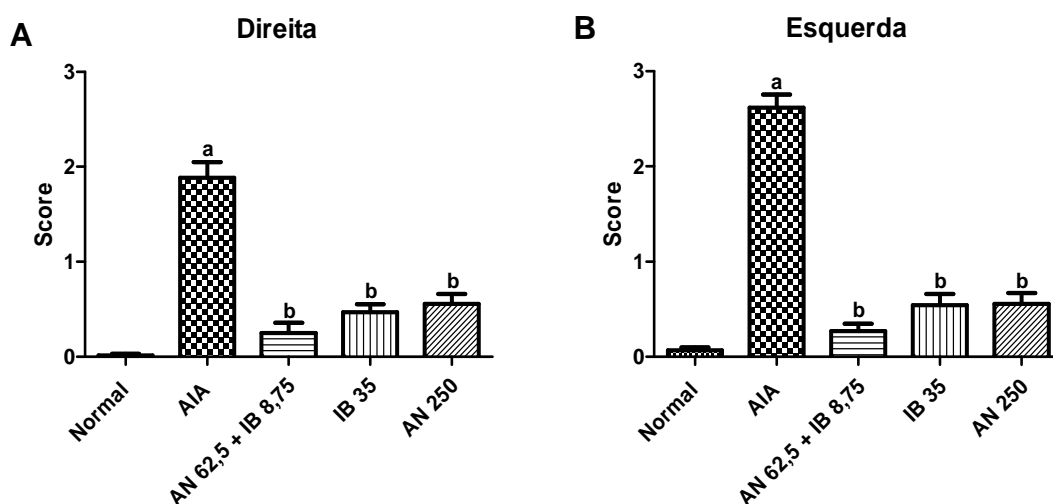


Figura 1A e 1B – Escore da membrana sinovial direita (A) e esquerda (B) da articulação femorotibial de ratos normais, artríticos (AIA), artríticos tratados com associação anetol + ibuprofeno (AN 62,5 mg/kg + IB 8,75 mg/kg), ibuprofeno (IB 35 mg/kg) e anetol (AN 250 mg/kg). Cada valor representa a média \pm EPM por grupo. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey. $P < 0,05$ comparado com o grupo de animais artríticos sem tratamento (AIA).

Conclusão

No conjunto, os dados forneceram evidências que a associação AN + IB, em doses mais baixas, apresentou potencial equivalente ao AN e IB em doses altas, para prevenir as alterações na membrana sinovial das articulações de ratos artríticos.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e à toda a equipe do laboratório de Inflamação do DFT/UEM.

Referências

ATKINSON, H. C. *et al.* Combination paracetamol and ibuprofen for pain relief after oral surgery: a dose ranging study. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 579-587, maio 2015.

DOMICIANO, T.P. *et al.* Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, n. 4, p. 331-338, dez 2012.

RITTER, A. M. V. *et al.* Anethole reduces inflammation and joint damage in rats with adjuvant-induced arthritis. **Inflammation Research**, v. 66, n. 8, p. 725-737, maio 2017.