

EFEITOS DA COMBINAÇÃO ANETOL + METOTREXATO SOBRE O EDEMA DE PATA E O METABOLISMO HEPÁTICO DE RATOS ARTRÍTICOS

Mariana Macedo Carmona (PIBIC/CNPq/UEM), Carla Indianara Bonetti, Lívia Bracht (orientador), e-mail: lbracht@uem.br.

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

Ciências Biológicas/Bioquímica

Palavras-chave: inflamação crônica; artrite reumatoide; fígado.

Resumo

O metotrexato (MTX), um fármaco antirreumático modificador do curso da doença, é um dos principais fármacos de escolha para o tratamento da artrite reumatóide (AR). Embora atue de maneira eficiente, sabe-se que o MTX provoca o surgimento de efeitos adversos que podem limitar seu uso. O trans-anetol (AN), composto presente nos óleos essenciais de espécies de anis, possui atividade antinociceptiva, hepatoprotetora e anti-inflamatória, podendo atuar de maneira complementar ao MTX. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi o de investigar os efeitos da combinação do AN com o MTX sobre o edema de pata e o metabolismo hepático de ratos artríticos. Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos machos da linhagem Holtzman, submetidos à indução da AR pela injeção intradérmica de adjuvante completo de Freund. Os tratamentos com o MTX e AN em monoterapia e a associação AN + MTX tiveram início no mesmo dia da indução da artrite e duraram cerca de 21 dias. Foi observado uma melhora significativa no edema das patas quando utilizado a associação AN (62,5 mg/Kg) + MTX (6 mg/Kg). Em relação ao metabolismo hepático, foi possível observar que o tratamento com a associação AN + MTX não preveniu as alterações metabólicas hepáticas nos animais artríticos. Este trabalho é importante pois confirma os benefícios da utilização de fármacos com mecanismos de ação complementares no tratamento da AR.

Introdução

A artrite reumatoide (AR) é caracterizada como uma doença autoimune inflamatória crônica que acomete o tecido sinovial das articulações, provocando destruição tecidual, dor, deformação articular, edema e diminuição da qualidade de vida do indivíduo. O tratamento desta doença baseia-se principalmente no uso de antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), corticosteroides, agentes imunobiológicos e drogas antirreumáticas modificadoras do curso da doença (DMARD), como o metotrexato (GOELDNER, ISABELA et al., 2011).

O metotrexato (MTX) é um antimetabólito que atua inibindo a enzima diidrofolato redutase (DHFR), promovendo inibição da proliferação celular, diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento dos níveis de adenosina. Todavia, seu uso está associado ao surgimento de efeitos adversos, como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, anemia, leucopenia, trombocitopenia, pancitopenia, efeitos gastrintestinais e muco-cutâneos (SEGAL; YARON; TARTAKOVSKY, 1990).

Neste sentido, muitas pesquisas vêm demonstrando que a associação entre fármacos que possuem mecanismos de ação complementares pode ser benéfica ao paciente artrítico por evitar o surgimento dos efeitos adversos e potencializar o efeito antiartrítico do MTX. O trans-anetol (AN), por exemplo, é um composto natural presente no óleo essencial de espécies de anis, que além de apresentar outros benefícios farmacológicos, possui ação hepatoprotetora e anti-inflamatória (CHEN; DEGRAFFENRIED, 2012).

Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi o de investigar os efeitos da combinação do AN com o MTX sobre o edema de pata e o metabolismo hepático de ratos artríticos.

Materiais e Métodos

Foram utilizados ratos Holtzman, divididos nos seguintes grupos: 1) animais controle normais; 2) animais controle artríticos (AIA); 3) animais artríticos tratados com MTX (6; 12 e 24 mg/Kg); 4) artríticos tratados com AN (62,5 e 250 mg/Kg); 5) animais artríticos tratados com a associação AN+MTX (62,5 mg/Kg + 6 mg/Kg, respectivamente). A artrite foi induzida pela injeção intradérmica da suspensão de adjuvante completo de Freund (ACF) na superfície plantar da pata esquerda. Os tratamentos foram iniciados no dia da indução da AIA. O anetol foi administrado diariamente, por via oral, e o metotrexato foi administrado uma vez por semana, por via intraperitoneal, nas doses descritas acima. O desenvolvimento do processo inflamatório foi acompanhado até o 21º dia. O edema das patas foi determinado por pletismografia. Em outra série experimental, os animais foram utilizados para os experimentos de perfusão isolada de fígado de rato, para avaliação da gliconeogênese a partir de lactato. Perfusão de fígado não-recirculante, livre de hemoglobina foi utilizada. O protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM (protocolo número 9937300419).

Resultados e Discussão

Pode-se observar na Figura 1 que a injeção subcutânea do ACF nas patas esquerdas dos animais provocou intensa resposta inflamatória caracterizada pelo surgimento imediato de edema acentuado na pata injetada (pata esquerda) e posterior surgimento de edema na pata contralateral não-injetada (pata direita). A utilização de anetol (62,5 mg/Kg) + metotrexato (6 mg/Kg) suprimiu significativamente o processo inflamatório a partir do 13º dia após a injeção de ACF e a evolução dos eventos

inflamatórios na pata contralateral não injetada. Quando utilizado os fármacos em monoterapia em doses semelhantes às utilizadas na associação, observou-se uma ineficiência do anetol em reduzir o edema nas patas do animal e a discreta capacidade do metotrexato de retardar o desenvolvimento da resposta inflamatória na pata esquerda. Na dose de 12mg/Kg, o MTX conseguiu reduzir o volume da pata esquerda alcançando uma redução de 48% do edema no 21º dia. Quando utilizada a maior dose de MTX, 24 mg/Kg, observamos um efeito anti-inflamatório pronunciado com redução de 72% do edema da pata esquerda no 21º dia.

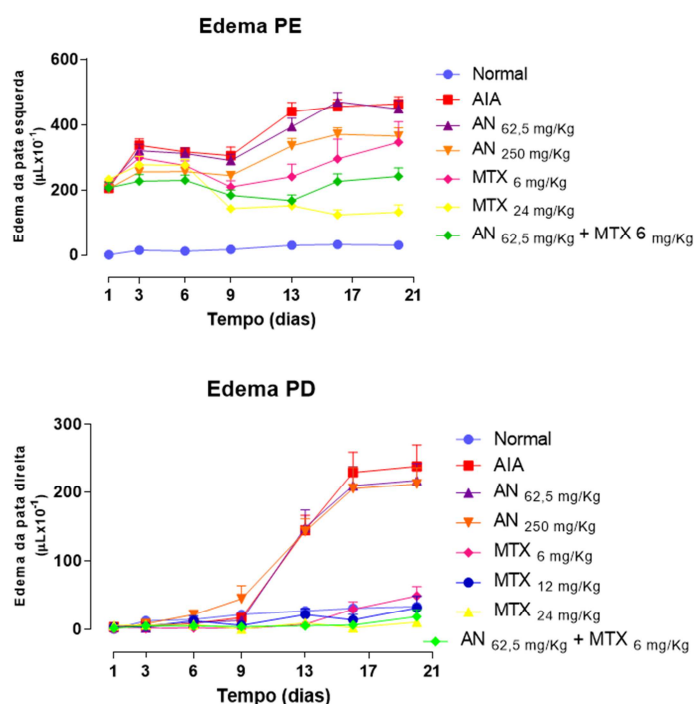


Figura 1: Evolução do edema das patas esquerda (PE, injetada) e direita (PD, não-injetada) de animais artríticos tratados com AN e MTX em monoterapia e em associação.

Quando realizado a perfusão do fígado dos ratos, observou-se que os animais artríticos controle possuem uma menor produção de glicose (gliconeogênese), menor consumo de oxigênio e maior produção de piruvato a partir do lactato como substrato no estado estacionário (Tabela 1). O tratamento dos animais com a associação AN + MTX não preveniu as alterações no metabolismo hepático dos animais artríticos. Somente o MTX nas doses mais altas (12 e 24 mg/Kg) foi capaz de prevenir, ainda que parcialmente, as alterações metabólicas dos animais artríticos. Nestas doses, tanto a produção de glicose quanto o consumo de oxigênio alcançaram valores semelhantes aos de animais normais. Não foi observado nenhum efeito sobre a produção de piruvato quando utilizado o MTX nas doses mais altas.

De maneira geral, em relação aos parâmetros inflamatórios, os resultados obtidos com a associação AN_{62,5mg/Kg} + MTX_{6mg/Kg} foram comparáveis aos resultados obtidos com a monoterapia de MTX na dose de 12 mg/Kg e

superiores aos obtidos com a monoterapia de AN na dose de 250 mg/Kg. Em relação às alterações metabólicas hepáticas, não foi observada a capacidade da associação reverter o quadro caracterizado pela redução de gliconeogênese e do consumo de oxigênio em animais artríticos. Apenas o tratamento com MTX na maior dose pareceu ser efetivo neste aspecto.

Tabela 1. Efeitos do tratamento de ratos artríticos com AN, MTX e AN + MTX no metabolismo do L- lactato no fígado de rato em perfusão

Parâmetros	Normal	Artrítico	AN + MTX 6	Anetol 62,5 mg/Kg	Anetol 250 mg/Kg	Metotrexato 6 mg/kg	Metotrexato 12 mg/kg	Metotrexato 24 mg/kg
Produção de Glicose ($\mu\text{mol. min}^{-1}. \text{g}^{-1}$)	1,41 \pm 0,11 ^a	0,87 \pm 0,08 ^b	0,74 \pm 0,08 ^b	0,63 \pm 0,05 ^b	0,71 \pm 0,07 ^b	0,94 \pm 0,04 ^{bc}	1,35 \pm 0,09 ^{ac}	1,40 \pm 0,17 ^c
Produção de Piruvato ($\mu\text{mol. min}^{-1}. \text{g}^{-1}$)	0,26 \pm 0,01 ^a	0,43 \pm 0,03 ^b	0,49 \pm 0,02 ^b	0,53 \pm 0,01 ^{bc}	0,56 \pm 0,03 ^c	0,59 \pm 0,04 ^c	0,39 \pm 0,03 ^b	0,41 \pm 0,02 ^b
Consumo de Oxigênio ($\text{nmol. min}^{-1}. \text{g}^{-1}$)	0,53 \pm 0,02 ^a	0,38 \pm 0,02 ^b	0,40 \pm 0,07 ^{bc}	0,47 \pm 0,04 ^b	0,43 \pm 0,03 ^b	0,49 \pm 0,03 ^{bc}	0,52 \pm 0,03 ^{abc}	0,57 \pm 0,04 ^{abc}

Os dados foram expressos como as médias \pm SEM de 5-6 animais. Foram usados fígados de ratos normais e de ratos artríticos tratados com diferentes doses de MTX e monoterapia com AN ou a combinação AN + MTX. Valores dos parâmetros de produção de glicose e piruvato em condições de estado estacionário (tempo de perfusão de 40 minutos) foram representados. Os valores de consumo de oxigênio representam o incremento na velocidade (Δ) de consumo de oxigênio devido à infusão de L- lactato. ^{abc} Para cada parâmetro, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$, ANOVA, teste de Tukey).

Conclusão

Os dados obtidos neste trabalho nos permitem concluir, portanto, que o uso do AN potencializa os efeitos antiartríticos do MTX, sendo capaz de diminuir a inflamação, embora não tenha prevenido as alterações metabólicas hepáticas associadas à doença.

Agradecimentos

Ao CNPQ pelo fomento e incentivo dados à pesquisa científica.

Referências

CHEN, C. H.; DEGRAFFENRIED, L. A. Anethole suppressed cell survival and induced apoptosis in human breast cancer cells independent of estrogen receptor status. **Phytomedicine**, v. 19, n. 8–9, p. 763–767, 2012.

GOELDNER, I. et al. Artrite reumatoide: uma visão atual. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** [online]. v. 47, n. 5, p. 495-503, 2011.

SEGAL, R.; YARON, M.; TARTAKOVSKY, B. Methotrexate: Mechanism of Action in Rheumatoid Arthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 20, n. 3, p. 190–199, 1990.