

2.10.06 – Farmacologia / Etnofarmacologia.

ATIVIDADE ANTI-HIPERALGÉSICA DE α -FELANDRENO EM MODELOS DE NEUROPATIA INDUZIDA POR IL-1 β E GP120 IN VIVO

Maria Tainara S. Carneiro¹; Ana Claudia Piccinelli², Cândida Aparecida L. Kassuya³

¹Acadêmica de Nutrição; ²Doutoranda em Ciências da Saúde; ³Docente e Orientadora

^{1,2,3}Faculdade de Ciências da Saúde - UFGD

Resumo:

O α -felandreno é um composto com efeitos anti-inflamatórios e anti-hiperalgésicos. O objetivo foi avaliar os efeitos da administração oral do composto α -felandreno em modelo animal de hiperalgesia induzida pela injeção intratecal de IL-1 β ou gp120 em camundongos. Foram utilizados camundongos Swiss, ciclo de 12h claro/escuro com temperatura de 22 \pm 1°C, umidade controlada, água e ração *ad libitum*. Realizaram-se os testes de sensibilidade mecânica e ao frio. Foi significativo * $p < 0.05$, pelos testes ANOVA e Student-Newman-Keuls. A administração intratecal de gp120 (300ng) ou IL-1 β (1ng) induziu a hiperalgesia em camundongos reduzindo significativamente sua sensibilidade ao frio e o α -felandreno na dose de 10mg/kg administrado oralmente foi capaz de reverter esses efeitos. Assim, α -felandreno quando administrado oralmente atenuou os efeitos hiperalgésicos das substâncias injetadas, corroborando com evidências anteriores de suas atividades anti-inflamatórias e anti-hiperalgésicas.

Autorização legal: Comitê de ética no uso de animais da UFGD (CEUA) (Nbr. 022 / 2014).

Palavras-chave: α -Felandreno; Hiperalgesia; Inflamação.

Apoio financeiro: Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC, vinculado à FCS-UFGD pela concessão de bolsa de Iniciação Científica.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFGD.

Introdução:

Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis, derivados do metabolismo secundário de plantas aromáticas (MACHADO & JUNIOR, 2011). Dentre eles, pode-se citar o

felandreno, o qual é um composto terpênico que está relacionado com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (HIM et al, 2008; DUNG et al, 2009). Este, pode apresenta-se como composto majoritário, em óleos extraídos de partes aéreas ou de folhas de algumas espécies de vegetais, como *Pimpinella junoniae*, *Pinus peuce*, *Peumus boldus* (VELASCO et. al., 2003; TSOUKATOU et. al., 2001; VILA et. al., 1999), *Mikania lindleyana* (SILVA, 2011), *Croton sonderianus*.

A hiperalgesia se traduz como uma resposta aumentada decorrente de uma sensibilização primária ou secundária do local de determinada lesão (FARQUHAR-SMITH, 2007). Assim, ocorre a produção de citocinas inflamatórias, como Interleucinas 1 beta (IL-1 β), designada como pró-inflamatória, por elevar a resposta inflamatória (OLIVEIRA et al., 2011) e, também, auxiliar no quadro de hiperalgesia.

Desta forma, a IL-1 β está associada com a cascata de inflamação, englobando o recrutamento de leucócitos, causando febre, realizando a síntese de proteínas de fase aguda e, assim, aumentando a permeabilidade dos vasos e a dor (VERRI et. al., 2006).

A gp120 é uma glicoproteína e um componente do envelope viral, a qual pode estimular a ativação de células da glia, causando a liberação de glutamato, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias (MILLIGAN et. al. 2001). A injeção intratecal de gp120 induz hiperalgesia aguda e a liberação de citocinas pró-inflamatórias na medula espinhal (ZHENG et. al., 2011).

Um estudo de análise fitoquímica do óleo essencial de uma planta mostrou a presença de α -felandreno puro, esse foi responsável por reduzir a hiperalgesia mecânica, assim como atividade depressiva e reduziu a hipersensibilidade induzida pelo frio (FORMAGIO et. al., 2011). Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa demonstrou atividades anti-hiperalgésica e antidepressiva do felandreno em modelo de lesão do nervo ciático em ratos (PICCINELLI et. al., 2014).

Portanto, objetivo do presente trabalho,

portanto, foi avaliar os efeitos da administração oral do composto α -felandreno em modelo animal de hiperalgesia induzida pela injeção intratecal de IL-1 β ou gp120 em camundongos.

Metodologia:

Animais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos Swiss machos (18-23 g) que foram divididos em grupos de seis. Os animais foram obtidos do biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da UFGD e foram mantidos em um ciclo de 12h claro/escuro com temperatura constante de 22 ± 1 °C, com umidade controlada (60-80%) e água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais da UFGD (CEUA) (Nbr. 022 / 2014). Os compostos α -felandreno e IL-1 β foram comprados da Sigma Chemical Co.

Injeção intratecal

Gp120 (300pg) ou IL-1 β (1 ng) foram diluídos em solução salina (0,9%) e injetados com uma micro-seringa de Hamilton (25 μ L) entre as vértebras L5 e L6 através da pele intacta. O volume injetado foi de 5 μ L após uma hora do tratamento por via oral com o composto α -felandreno (10mg/kg) (SHIMIZU et al., 2004; MURAI et al., 2014).

Para cada citocina, os animais foram divididos entre os seguintes grupos: grupo controle, que recebeu salina estéril por via oral e também via intratecal, grupo controle positivo, que recebeu gp120 ou IL-1 β via intratecal e solução salina via oral e o grupo felandreno, que recebeu gp120 ou IL-1 β intratecal e α -felandreno via oral (10mg/kg).

Teste de Sensibilidade Mecânica

A sensibilidade mecânica foi determinada pelo limiar de retirada de pata utilizando a versão eletrônica dos filamentos de Von Frey. O aparelho foi posicionado na pata traseira direita do animal e a pressão em gramas determinada após o estímulo de retirada da pata (ZHENG *et al.*, 2011). As mensurações foram realizadas 2 e 3 horas após a injeção intratecal de gp120 ou IL-1 β e salina (controle).

Teste de Sensibilidade ao Frio

O teste de sensibilidade ao frio foi realizado após o teste de sensibilidade

meccânica, 2 e 3 horas após a injeção intratecal. Neste teste, uma seringa de 20 μ L de acetona foi posicionada próximo da pata traseira direita do animal e o líquido foi liberado. Os animais foram observados por 20 segundos e o número de retiradas da pata e o deslocamento do animal foi mensurado.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando Graph PadPrism 5.0 e apresentados como média \pm SEM. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Asteriscos (*) denotam diferença significativa na comparação entre os grupos.

Resultados e Discussão:

O trabalho demonstra que a administração intratecal de gp120 (300ng) (Figura 1) ou IL-1 β (1ng) (Figura 2) é capaz de induzir a hiperalgesia em camundongos reduzindo significativamente sua sensibilidade mecânica e sensibilidade ao frio. O α -felandreno na dose de 10mg/kg administrado oralmente foi capaz de reverter esses efeitos após 2 e 3 horas quando comparado ao grupo controle.

Além disso, a administração do via oral α -felandreno como tratamento nas doses de 10mg/kg, reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela administração intratecal de gp120 nos animais após 2 e 3 horas. As inibições máximas foram de $59 \pm 13\%$ e $89,8\%$, com valor de $*p < 0.05$.

O teste de sensibilidade ao frio, também foi realizado após 2 e 3 horas da injeção intratecal de gp120 e o tratamento oral com o α -felandreno, diminuindo a hiperalgesia ao frio com inibições máximas de $91 \pm 18\%$ e $90 \pm 14\%$, após 2 e 3 horas de administração, respectivamente.

Os efeitos da injeção intratecal de IL-1 β (1ng) evidenciaram a capacidade significativa de induzir sensibilidade mecânica e ao frio em camundongos. O tratamento oral com α -felandreno preveniu significativamente a hipersensibilidade mecânica após 2 e 3 horas da injeção intratecal de IL-1 β quando comparada ao controle, com uma inibição máxima de $78 \pm 10\%$ após 2 horas e $61 \pm 12\%$ após 3 horas ($*p < 0,05$). Porém, o α -felandreno administrado por via oral não foi capaz de reverter significativamente a hiperalgesia na sensibilidade ao frio.

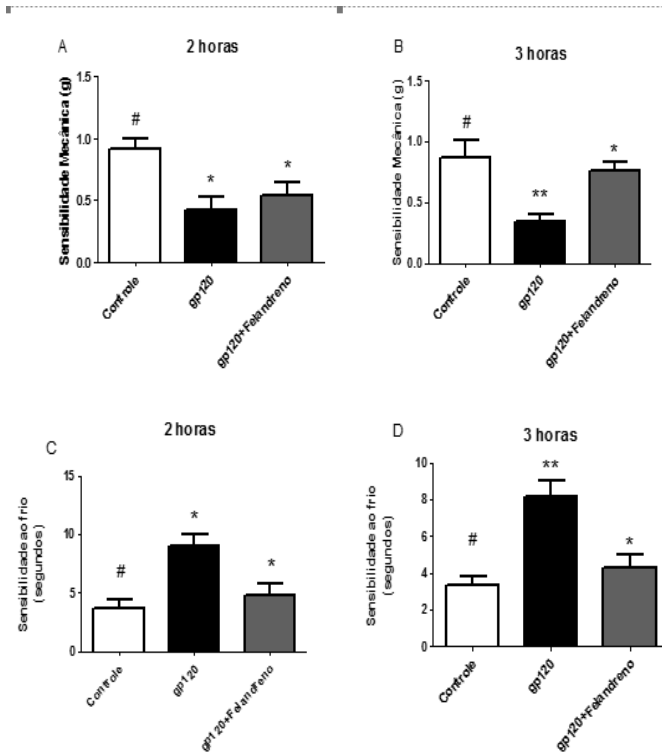


Figura 1. A e B: Efeitos da administração oral de felandreno no limiar de retirada de pata, no teste de sensibilidade mecânica em camundongos após injeção intratecal de gp120. Os animais receberam por via intratecal 300ng de gp120 ou solução salina (controle). A sensibilidade mecânica foi avaliada após 2 e 3 horas após a injeção. **C e D** Efeito da administração oral de felandreno no teste de hipersensibilidade ao frio em camundongos após a injeção intratecal de gp120. A sensibilidade ao frio foi avaliada após 2 e 3 horas após a injeção. Análises estatísticas foram expressas em média \pm DPM de 6 animais comparando o grupo controle VS grupo tratado. * $p < 0,05$.

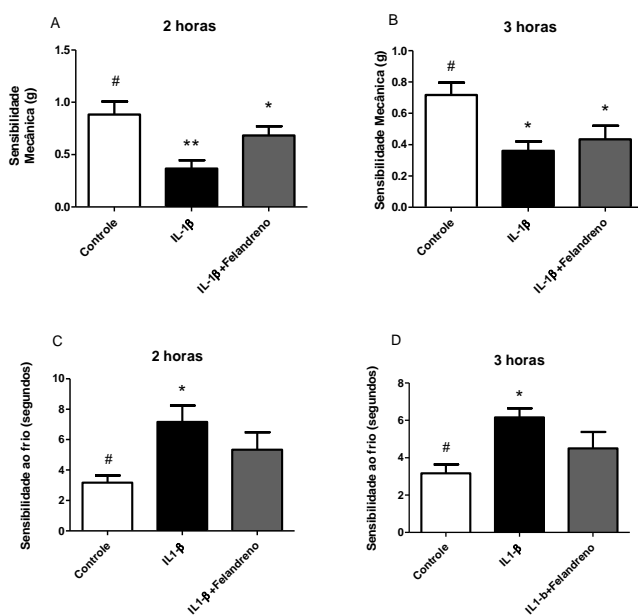


Figura 2. A e B: Efeito da administração oral de felandreno no limiar de retirada de pata, no teste de sensibilidade mecânica em camundongos após injeção intratecal de IL-1 β . Os animais receberam

por via intratecal 1ng de IL-1 β ou solução salina (controle). A sensibilidade mecânica foi avaliada após 2 e 3 horas após a injeção. **C e D** Efeito da administração oral de felandreno no teste de hipersensibilidade ao frio em camundongos após a injeção intratecal de IL-1 β . A sensibilidade ao frio foi avaliada após 2 e 3 horas após a injeção. Análises estatísticas foram expressas em média \pm DPM de 6 animais comparando o grupo controle VS grupo tratado. * $p < 0,05$.

Estudos demonstram que as citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a IL-1 β , são responsáveis pelo desenvolvimento da hiperalgesia mecânica induzida pela gp120 (MILLIGAN et. al., 2001). Estudos anteriores com o α -felandreno apontam que esse composto pode estar relacionado com atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e anti-hiperalgésica (HIM et. al., 2008; DUNG et. al., 2009; PICCINELLI et. al., 2014), o que justifica sua utilização no presente trabalho e correlaciona-se com os resultados apresentados.

O possível mecanismo de ação do felandreno envolve os sistemas glutamatérgico, opióide, nitrérgica, colinérgicos e adrenérgicos. Em estudos do óleo essencial de *S. terebinthifolius* e compostos presentes neste óleo, incluindo (R) - (+) - limoneno e α -felandreno. Piccinelli et. al. (2014) demonstrou a capacidade do α -felandreno em inibir a hiperalgesia ao frio em ratos. E, assim, os resultados obtidos no estudo mostraram-se positivos e condizentes com os estudos de Lima et. al. (2012) e Piccinelli et. al. (2014).

Conclusões:

O presente trabalho demonstrou que tanto a gp120 quanto a IL-1 β são capazes de induzir hiperalgesia quando administradas intratecalmente. E o α -felandreno, por sua vez, quando administrado oralmente foi capaz de atenuar os efeitos hiperalgésicos das substâncias injetadas, corroborando com evidências anteriores de suas atividades anti-inflamatórias e anti-hiperalgésicas.

Diante disso o felandreno se destaca como substância promissora em futuros estudos de modulação da hiperalgesia em pacientes portadores de tal condição, sobretudo aqueles com dor neuropática.

Referências bibliográficas

DUNG, N. T.; BAJPAI, V. K.; YOON, J. I.; KANG, S. C. Anti-inflammatory effects of essential oil isolated from the buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and

Perry. **Food and Chemical Toxicology**, vol.47, p.449–453, 2009.

FARQUHAR-SMITH, W. P. **Anatomy, physiology and pharmacology of pain**. Anaesthesia and Intensive Care Medicine-Pain, vol 9, nº 1, p.3-7, 2007.

FORMAGIO, A. S. N; IRIGUCHI, E. K. K.; ROVEDA, L. M.; VIEIRA, M. d. C.; CARDOSO, C. A. L.; ZARATE, N. A. H.; TABALDI, L. A.; KASSUYA, C. A. L. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) fruits, **Latin. Am. J. Pharm.**, v.30, 2011.

HIM, A.; OZBEK, H.; TUREL, I.; ONER, A. C. **Antinociceptive Activity of Alpha-pinene and Fenchone**. Pharmacologyonline, vol 3, p.363-369, 2008.

LIMA, D. F.; BRANDAO, M. S.; MOURA, J. B.; LEITAO, J. M.; CARVALHO, F. A.; MIURA, L. M. Antinociceptive activity of the monoterpene alpha-phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. **J Pharm Pharmacol**, v.64, n.9, p.283–292, 2012.

MILLIGAN, E. D; O'CONNOR, K. A.; NGUYEN, K. T.; ARMSTRONG, C. B.; TWINING, C.; GAYKEMA, R. P. A.; HOLGUIN, A.; MATIN, D.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Intrathecal HIV-1 Envelope Glycoprotein gp120 Induces Enhanced Pain States Mediated by Spinal Cord Proinflammatory Cytokines. **The Journal of Neuroscience**. n.21, n.8, p.2808-2819. 15 abr. 2001.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v.61, n.2, p.255-265, 2011.

PICCINELLI, A. C.; SANTOS, J. A.; KONKIEWITZ, E. C.; OESTERREICH, S. A.; FORMAGIO, A. S.; CRODA, J.; ZIFF, E. B.; KASSUYA, C. A. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, alpha-phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. **Nutr. Neurosci.**, v.18, n.5, p.217-224, 2015.

SHIMIZU, T.; KATAHIRA, M.; SUGAWARA, H.; INOUE, K.; MIYATA, A. Diverse effects of intrathecal pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on nociceptive transmission in mice spinal cord. **6th International Symposium on VIP, PACAP**

and Related Peptides. Vol. 123, Issues 1-3, p. 117-122. 15 dez. 2004.

TSOUKATOU M.; TSITSIMPIKOU C.; VAGIAS C.; ROUSSIS V. **Chemical intra-Mediterranean variation and insecticidal activity of *Crithmum maritimum***. Z Naturforsch [C]., v.56, p.211-215,2001.

VELASCO-NEGUERUELA A.; PEREZ-ALONSO MJ; PEREZ DE PAZ PL; PAUL-PALA J.; SANZ J. **Analysis by gás chromatography-mass spectrometry of the essential oil from the aerial parts of *Pimpinella junoniae* Ceb. & Ort.**, gathered in La Gomera, Canary Islands, Spain. **J. Chromatogr A.**, v.1011, p.241-244, 2003.

VERRI JR, W.A., CUNHA, T.M., PARADA, C.A., POOLE, F.Q.C., FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.116-138, 2006.