

# CONIC SEMESP

15º Congresso Nacional de Iniciação Científica

**TÍTULO:** ESTUDO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA ARCTIUM LAPPA EM MODELO DE UVEÍTE

**CATEGORIA:** CONCLUÍDO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** MEDICINA

**INSTITUIÇÃO:** FACULDADES INTEGRADAS PADRE ALBINO

**AUTOR(ES):** LEONARDO ISA BOTURA, LÍVIA PAULA FERREIRA LOPEZ, MARIA LUIZA CAETANO DA SILVA SOUZA, PAOLA DANTAS MARTINS ARRUDA

**ORIENTADOR(ES):** ANA PAULA GIROL

**COLABORADOR(ES):** GISELDA PEREIRA DA SILVA RODRIGUES, HELENA RIBEIRO SOUZA, MELINA MIZUSAKI IYMASA

Realização:



Apoio:



## 1. RESUMO

A uveíte é uma inflamação intraocular que compromete total ou parcialmente a íris, o corpo ciliar e a coroide, com envolvimento frequente do vítreo, retina e vasos sanguíneos. Atualmente o principal tratamento para essa condição ocular são os corticosteroides, que apresentam severos efeitos colaterais. O presente trabalho tem como objetivo investigar *in vivo* os efeitos anti-inflamatórios da erva bardana (*Arctium lappa*), por meio de aplicações tópicas, na uveíte experimental em ratos, sendo uma opção a ser considerada em pacientes com uveíte. Foram utilizados ratos fêmeas, da espécie *Rattus norvegicus*, que foram anestesiados e inoculados na pata direita com 1 mg/kg de lipopolissacarídeo (LPS) para o desenvolvimento da uveíte. Logo em seguida, será administrado via intraperitoneal, o extrato da *A. lappa* a 30%. Os animais foram eutanasiados, após 24 horas da administração do LPS, por dose excessiva do anestésico. Animais sem manipulação foram usados como controles. A eficácia dos medicamentos será avaliada por meio da quantificação dos leucócitos extravasados no humor aquoso, análises histopatológicas e das expressões de mediadores anti e pró-inflamatórios.

**Palavras-chave:** uveíte, fitoterápicos, bardana.

## 2. INTRODUÇÃO

O termo uveíte indica inflamação da coroide (coroidite), do corpo ciliar (uveíte intermediária, ciclite, uveíte periférica, ou pars planite), ou da íris (irite), e pode estar associada a condições inflamatórias autoimunes ou infecciosas (Michel; Foster, 2002; Vaughan et al., 2003, Rosembaum, 2011). Esta inflamação, que é caracterizada pelo acúmulo de leucócitos nos tecidos oculares, pode afetar qualquer parte do olho (Durrani et al., 2004; Muñoz-Fernández; Martin-Mola, 2006). A natureza recorrente desse processo inflamatório pode resultar em complicações secundárias como catarata, glaucoma, descolamento de retina e, por fim, destruição dos tecidos oculares e cegueira. É um processo doloroso e associado à fotofobia (Muñoz-Fernández; Martin-Mola, 2006; Read, 2006). A uveíte geralmente afeta pessoas entre 20 a

50 anos de idade e corresponde a cerca de 10 a 15% dos casos de cegueira nos países desenvolvidos (Vaughan et al., 2003).

As causas das uveítes podem ser influenciadas por fatores genéticos, geográficos e relacionadas ao meio ambiente. É importante conhecer as características epidemiológicas e clínicas relacionadas às diversas entidades que causam uveíte para que se tenha um diagnóstico acurado e que se possa instituir um tratamento adequado, com o objetivo de minimizar os danos causados por estas patologias (Costa et al., 2006).

Com base na localização anatômica da inflamação, as uveítes podem ser classificadas em quatro grupos: uveíte anterior (inflamação localizada na íris, ou corpo ciliar, ou ambos); uveíte intermediária (inflamação primária do corpo ciliar, coroide e retina periférica); uveíte posterior (inflamação primária da coroide) e uveíte difusa ou pan-uveíte (inflamação de todos os componentes anatômicos da úvea-íris, corpo ciliar e coroide). As uveítes cuja inflamação duram semanas ou poucos meses, e que terminada a crise desaparecem, são chamadas uveítes agudas. Nas uveítes crônicas a inflamação dura meses ou anos, sem seu desaparecimento completo entre os períodos de exacerbação (Dimantas et al., 2003).

As uveítes têm causas diversas e muitas vezes elas são secundárias à diversas doenças sistêmicas, como a artrite reumatóide juvenil, por exemplo. Entre as outras causas de uveíte, temos a toxoplasmose, os vírus (herpes, citomegalovírus), e as bactérias. Algumas uveítes apresentam etiologia não completamente esclarecida, como a doença de Behçet e a síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (Commodaro et al., 2010).

O modelo animal de uveíte induzida por endotoxina (EIU) (Rosenbaum et al., 1980) tem sido usado por vários pesquisadores para o entendimento da patogênese da uveíte (Becker et al., 2000; Yang et al., 2003). A exposição ao lipopolissacarídeo (LPS) induz a expressão de vários mediadores da inflamação como o óxido nítrico (NO) (Goureau et al., 1995), fator ativador plaquetário, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), prostaglandinas, interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e outras citocinas (Gupta et al., 2008; Medeiros et al., 2008). Ainda, o LPS pode causar alterações na expressão de moléculas de adesão, tais como a L-selectina e as integrinas CD11/CD18 (Rodrigues et al., 2007).

O aumento na expressão destes mediadores inflamatórios contribui para o desenvolvimento da uveíte por meio da quebra da barreira hemato-ocular, o que leva a infiltração de células inflamatórias no humor aquoso e o extravasamento de proteínas (Becker et al., 2000; Hafezi-Moghadam et al., 2006; Gupta et al., 2008; Medeiros et al., 2008). Na uveíte experimental, o início da transmigração dos neutrófilos na íris ocorre entre duas a quatro horas após a administração da endotoxina (Becker et al., 2000). O processo inflamatório atinge o pico máximo em 24 horas após a injeção de LPS e, gradualmente, regride nas próximas 24 horas (Yang et al., 2003; Hafezi-Moghadam et al., 2006).

Atualmente, o tratamento das uveítes se faz, na maioria dos casos, através de medicação (oral e colírios) em que inclui corticosteróides agentes quimioterápicos e inibidores de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). No entanto, os efeitos colaterais desses fármacos, como o aumento da pressão ocular ou citotoxicidade, limitam os seus usos. Portanto, existe uma demanda óbvia para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Durrani et al., 2004; Smet, 2005; Read, 2006; Resenbaum, 2011).

A utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos para a recuperação da saúde é uma prática comum, sendo o resultado do acúmulo secular de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais por diversos grupos étnicos (Simões et al., 1986). Diversos estudos mostram que os medicamentos fitoterápicos são amplamente comercializados em muitos países, principalmente, EUA (Barnes et al., 2004; Blumenthal et al., 2006), Europa (Menniti-Ippolito et al., 2002; Hartel & Volger, 2004; De Smet, 2005) e Brasil (Momesso, 2002; Ribeiro et al., 2005; Silva et al., 2006).

### 3. OBJETIVO

Investigar *in vivo* os efeitos anti-inflamatórios da erva bardana (*Arctium lappa*), por meio de administrações sistêmicas, na uveíte experimental em ratos.

### 4. METODOLOGIA

A pesquisa foi feita por meio de análises histopatológica e quantitativa de leucócitos (em câmara de Neubauer), análises imuno-histoquímicas de Anxa1, Cox2 e NFKB, além de análises estatísticas. A pesquisa foi realizada na Unidade de Desenvolvimento em Pesquisa Experimental das Faculdades Integradas Padre Albino (UDPE- FIPA). Foram utilizados durante a pesquisa *Rattus norvegicus* fêmeas-wistar (CEUA 09.06.04-04), com 6 a 8 semanas de vida, e peso entre 150 a 200g, os quais foram separados em 3 grupos (n=4/cada), sendo um grupo controle e dois grupos experimentais. Para o desenvolvimento da uveíte induzida por endotoxina (EIU), os animais foram anestesiados com isoflurano (1%) e inoculados na pata direita com 1 mg/kg de lipopolissacarídeo (LPS, tipo *Escherichia coli*, sorotipo 0127: B8, Sigma Chemical. Co. Poole, Dorset, UK) diluído em 0,1 ml de solução salina tamponada (PBS) (Silva, 2007). Os animais foram mantidos nessas condições por 24 horas e, então, sacrificados por dose excessiva do anestésico. Em um dos grupos experimentais, os animais foram tratados sistemicamente com fitoterápicos *A.lappa* (bardana a 30% -i.p., logo após inoculação de LPS). Após 24 horas, os animais foram eutanasiados e as amostras de humor vítreo, humor aquoso, sangue foram colhidas e os olhos coletados.

## 5. DESENVOLVIMENTO

### Preparo dos medicamentos fitoterápicos

As folhas e as raízes das plantas foram secadas ao ar por aproximadamente três dias, e posteriormente picadas com auxílio de uma tesoura. Os extratos aquosos foram obtidos pela mistura de 200 gramas de matéria seca com 800 gramas de álcool 70º GL, e então, macerados por 15 dias, com homogenizações diárias (Ferris; Zheng, 1999, modificado). Após macerados, os extratos foram filtrados e armazenados em frascos âmbar.

### Análise Histopatológica

Após a coleta do humor aquoso, os olhos dos animais controle e experimentais foram fixados em formol a 10%, desidratados em ordem

crescente de álcool e incluídos em parafina para as análises histopatológicas. Para essas análises, cortes de 5  $\mu\text{m}$  foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) as lâminas foram montadas com Entelan e analisadas no microscópio Leica do Laboratório Multidisciplinar das FIPA.

### **Análises Imunohistoquímicas de marcadores de inflamação**

As expressões das proteínas anti-inflamatórias anexina-A1 (ANXA1), da enzima pró-inflamatória cicloxigenase-2 (COX2) e do fator de transcrição nuclear KB (NFKB) foram detectadas em cortes de 5 $\mu\text{m}$  das biópsias selecionadas, por meio dos anticorpos primários policlonais *rabbit* anti-ANXA1 (1:2000); anti-COX2 (1:1000), anti-NFKB (1:200) (Zymed Laboratories, Cambridge, UK). Os cortes foram preparados em lâminas sinalizadas e, então: (a) desparafinizados e hidratados em água por 5 minutos; (b) incubados em calor úmido em solução tampão citrato, pH 6,0, por 20 minutos para a recuperação antigênica; (c) lavados em água destilada e deixados em solução de peróxido de hidrogênio (p.a) a 3% em metanol, por 30 minutos, para o bloqueio de peroxidase endógena; (d) lavados com PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (e) incubados *overnight* com os anticorpos primários diluídos em BSA a 1%, em câmara úmida a 4°C; (f) lavados com PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (g) incubados com o anticorpo secundário biotilado (kit Zymed, Invitrogen) por 30 minutos; (h) lavados com PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (i) imersos em complexo estreptavidina peroxidase conjugada por 30 minutos; (j) lavados com PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (k) incubados em substrato diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos a 37° C, no escuro, para revelação (Kit Zymed, Invitrogen); (l) lavados em água destilada, contra-corados com Hematoxilina e montados em lâminas com BIOMOUNT (British Biocell International, Cardiff, UK).

Todos os fragmentos processados imuno-histoquimicamente foram analisados no microscópio Leica e as proteínas quantificadas no analisador de imagens (*software Leica image analysis*).

### **Análises estatísticas**

Para as quantificações das proteínas ANXA1, COX2 e NFKB, após análises imuno-histoquímicas, foi utilizada uma lâmina de cada animal (n=4/grupo), dos diferentes grupos. Por meio do *software Leica image analysis* e da objetiva de 40X do microscópio Leica, foram analisados vinte diferentes pontos das células epiteliais e nervosas seis diferentes regiões para obter uma média relacionada com a intensidade de imunorreatividade. Os valores foram obtidos como unidades arbitrárias (u.a.) e a densidade óptica média (D.O.M.) mostrou a intensidade de imunomarcção apenas nas áreas imunoreativas (Damazo et al., 2006).

## 6. RESULTADOS

As quantificações revelaram redução no influxo de leucócitos, especialmente neutrófilos, no humor aquoso ( $p<0,01$ ) e de neutrófilos e monócitos no sangue ( $p<0,01$ ) dos animais tratados com extrato de *A. lappa* comparado ao grupo EIU não tratado (Figura 1). As análises histopatológicas mostraram grande quantidade de leucócitos, especialmente neutrófilos, nas câmaras e tecidos oculares dos animais não tratados (Figura 2). Os estudos imuno-histoquímicos revelaram aumento na expressão da Anxa1 e redução da Cox2 e do NFKB após tratamento com *A. lappa* (Figura 3).

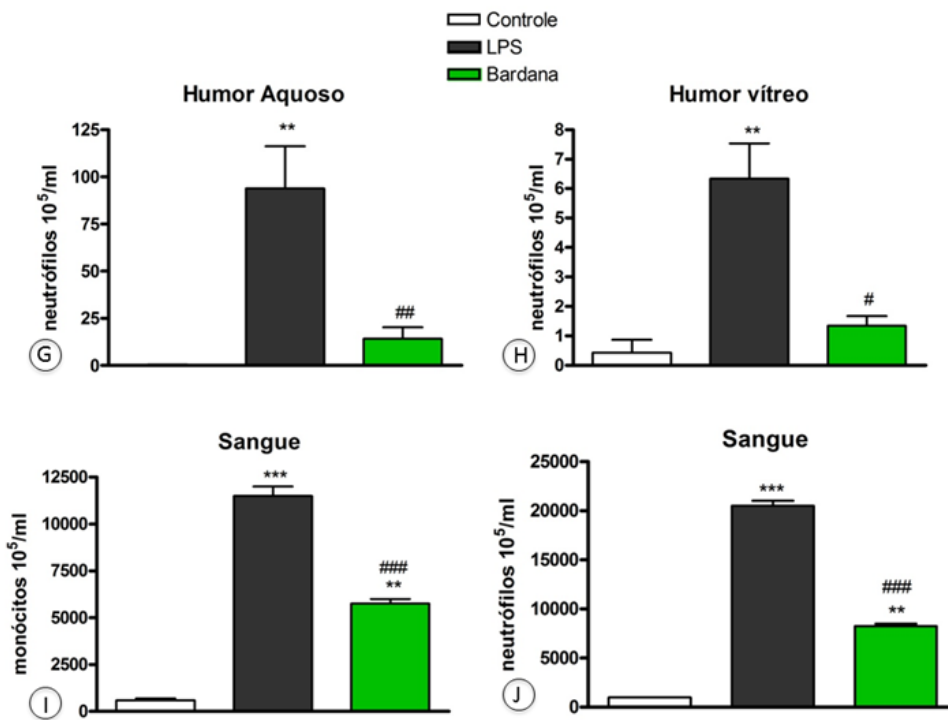
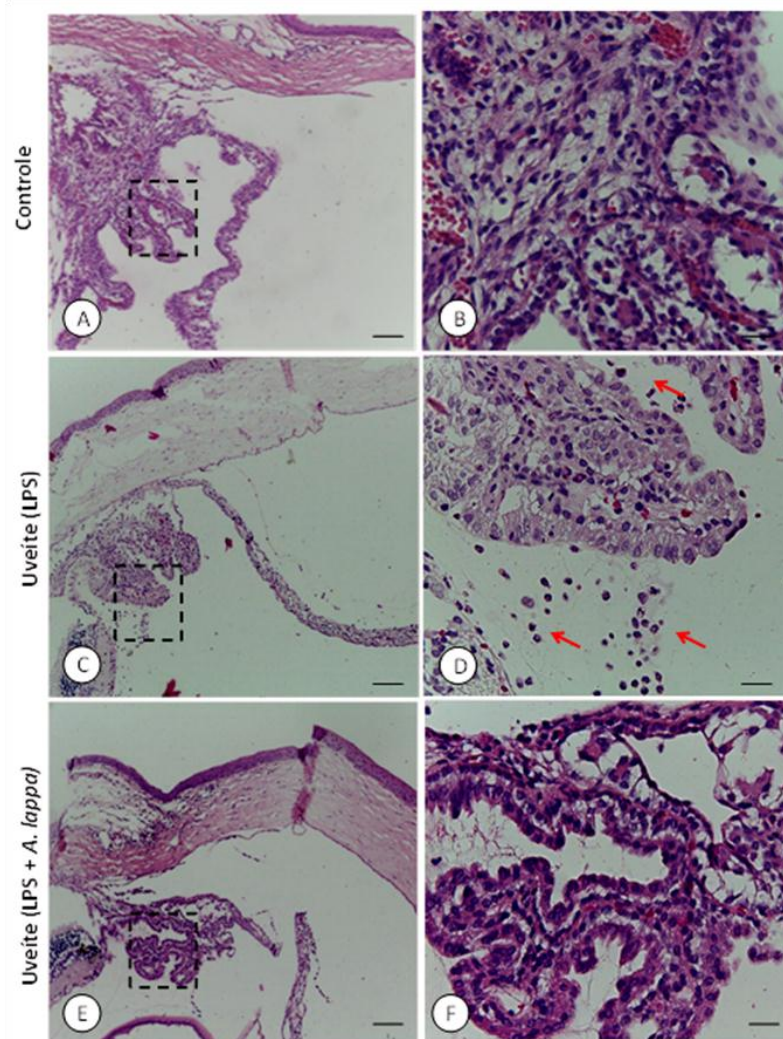
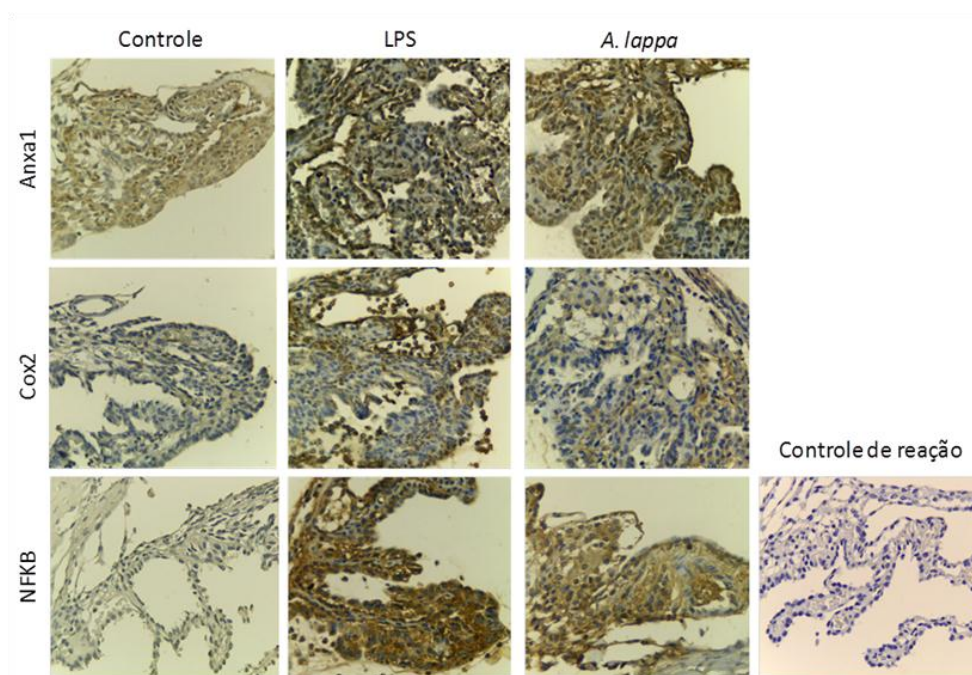


Figura 1. Análises quantitativas dos neutrófilos no humor aquoso (HA) (A) e no humor vítreo (HV) (B) e dos monócitos (C) e neutrófilos (D) no sangue (D). Os dados mostram média ± SEM. (n=4 animais/grupo). \*\*\*p<0,001 e \*\*p<0,01 versus controle, ### p<0,001, ## p<0,01 e # p<0,05 versus LPS.





**Figura 2. Histopatologia dos tecidos oculares.** Corpo ciliar com ausência de células inflamatórias nos animais controles (A) e (B). Influxo de células inflamatórias no corpo ciliar 24 horas após a indução da uveíte (C) e (D). Corpo ciliar com redução significativa de células inflamatórias após tratamento *A. lappa* (D) e (F). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Secções: 5µm. Barras: 10µm.



**Figura 3: Expressões das proteínas Anxa1, Cox2 e NFKB na EIU.** Aumento na imunorreatividade para as proteínas após administração do LPS (24h) sem tratamento. Expressão acentuada da Anxa1 e diminuição na expressão de COX2 e NFKB após tratamento com *A. lappa*.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados sugerem que o extrato de *A. lappa* apresenta atividades anti-inflamatórias importantes na uveíte induzida por endotoxina.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Michel;Foster, 2002; Vaughan et al., 2003, Rosembaum, 2011

Durrani et al., 2004; Muñoz-Fernández; Martin-Mola, 2006

Muñoz-Fernández; Martin-Mola, 2006; Read, 2006

Vaughan et al., 2003

Costa et al., 2006

Dimantas et al., 2003

Commodaro et al., 2010

Rosenbaum et al., 1980

Becker et al., 2000; Yang et al., 2003

Goureau et al., 1995

Gupta et al., 2008; Medeiros et al., 2008

Rodrigues et al., 2007

Becker et al., 2000; Hafezi-Moghadam et al., 2006; Gupta et al., 2008;  
Medeiros et al., 2008

Becker et al., 2000

Yang et al., 2003; Hafezi-Moghadam et al., 2006

Durrani et al., 2004; Smet, 2005; Read, 2006; Resenbaum, 2011

Simões et al., 1986

Barnes et al., 2004; Blumenthal. et al., 2006

Menniti-Ippolito et al., 2002; Hartel & Volger, 2004; De Smet, 2005

Momesso, 2002; Ribeiro et al., 2005; Silva et al., 2006