

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS FLAVONÓIDES RUTINA E QUERCETINA NA HIPERREATIVIDADE PULMONAR EM CAMUNDONGOS ASMÁTICOS

Paula AA^{1,2}; Benachio D. S¹; Barbosa A.M.²; Cogo J. C.²; Arakawa N.S. Ribeiro W.²

¹ Universidade Gama Filho, Especialização em Fisioterapia em Cardiorrespiratório

² Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP - Brasil

² Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D - UNIVAP - Brasil

Fone: +55 12 3947 1106, fisioaap@gmail.com; debora_benachio@hotmail.com; niton@univap.br;

jccogo@univap.br; gton@univap.br

Resumo - A asma é uma doença inflamatória crônica pulmonar caracterizada por hiperreatividade das vias aéreas. Tradicionalmente a utilização de produtos naturais é considerada uma grande fonte para descobertas de novos agentes terapêuticos, dentre as diversas classes de compostos podemos citar os flavonóides. Este estudo teve o objetivo de analisar a ação farmacológica dos flavonóides Rutina e Quercetina através do modelo experimental de hiperreatividade pulmonar induzido com LPS. Foram utilizados 35 camundongos da linhagem Balb/c, os quais foram separados em cinco grupos. O processo inflamatório foi induzido pela instilação de LPS e antes deste procedimento, 2 grupos receberam tratamento com flavonóides, 1 com corticóide e 2 com salina. Após 24 horas, foi coletado o LBA dos animais e realizada a contagem total de células inflamatórias. Os dados foram analisados por meio do teste estatístico. Observamos que os grupos desafiados pelo LPS e tratados com os flavonóides tiveram redução do número de células totais no LBA. Concluímos que a utilização destes flavonóides isolados pode possuir atividades antiinflamatórias, sugerindo assim suas potencialidades para fins terapêuticos.

Palavras-chave: Asma, Hiperreatividade Pulmonar, Flavonóides, Rutina, Quercetina.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Farmácia

Introdução

A asma brônquica pode ser definida como uma doença inflamatória crônica caracterizada por obstrução variável e reversível da via aérea e hiperreatividade brônquica (DALCIN; PERIN, 2009). Acomete cerca de 5% da população adulta mundial. No Brasil, é a quarta causa de internações e responsável por 2,6% das visitas em postos de emergências da rede pública (BRANDÃO et al., 2009).

Observa-se que na asma o processo inflamatório é um dos principais fatores de complicação, pois ocasiona alterações do fluxo sanguíneo (vasodilação com o aumento da permeabilidade das vênulas, extravasamento de fluídos, formação do edema), além da migração de células inflamatórias neutrófilos, células dendríticas, monócitos/macrófagos, linfócitos e principalmente eosinófilos (POBER; SESSA, 2007).

Para o asmático os corticosteróides podem ser considerados como o pilar terapêutico do tratamento, pois propicia alívio rápido e direto dos sintomas, porém como todo fármaco sintético, os corticóides apresentam uma vasta lista de efeitos

colaterais como: supressão adrenal, desmineralização óssea, alterações do metabolismo dos carboidratos, redução linear do crescimento infantil, distúrbios comportamentais, alterações no metabolismo hidrossalino, edema, hiperglicemia entre outros (CORREA; MELO; COSTA, 2008).

A utilização de produtos naturais é uma grande fonte para descobertas de novos agentes terapêuticos, entre eles podemos citar os flavonóides (OLIVEIRA et al.; 2010). Os flavonóides pertencem a uma classe de compostos fenólicos e são encontrados em diversas fontes vegetais, como frutas, grãos, flores, folhas e são capazes de atuar como imunomoduladores, antiinflamatórios, antivirais, bactericidas, hepatoprotetores, gastroprotetores e antioxidantes (GUARDIA et al.; 2001).

Assim, esperou-se analisar a ação farmacológica dos flavonóides Hidrato de Rutina e Dihidrato de Quercetina através do modelo experimental de hiperreatividade pulmonar induzido com lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* em camundongos asmáticos.

Metodologia

Para consecução dos objetivos propostos deste trabalho, optou-se por um estudo experimental. Todos os procedimentos seguiram as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA/91) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Vale do Paraíba, protocolo nº A059/2009/CEP.

Foram utilizados 35 camundongos da linhagem Balb/c, fêmeas, adultas jovens, pesando $24g \pm 2g$, provenientes do biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade de Campinas (CEMIB-UNICAMP) e alojados no biotério do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, em condições de ciclo claro e escuro (12h) e ração e água ad libitum. Após o período de adaptação dos animais, os mesmos foram separados aleatoriamente em 5 grupos experimentais, sendo: controle salina estéril ($n = 7$); LPS ($n=7$); LPS + D ($n= 7$); LPS + R ($n=7$) e LPS + Q ($n=7$).

Trinta minutos antes da instilação de LPS, os animais do grupo LPS+R e LPS+Q receberam respectivamente as substâncias isoladas, Hidrato de Rutina (15 mg/kg) e Dihidrato de Quercetina (15mg/kg) (Sigma®) via i.p. diluídos em volume constante de 100µl de salina estéril. O grupo LPS + D, recebeu dexametasona na dose 5mg/kg por via i.p. diluídos em 100µl de salina estéril. Os grupos Controle e LPS também receberam por via i.p. 100µl de salina estéril (0,9%). Após trinta minutos, os animais dos grupos LPS, LPS+D, LPS+R e LPS+Q sob anestesia inalatória (halotano), receberam o LPS de *Escherichia coli* por instilação via intranasal, com auxílio de uma micropipeta automática de 100 µl, na dose de 0,5 mg/kg, diluídos em 60 µl de solução salina estéril (0,9%). E o grupo controle seguindo o mesmo procedimento recebeu a mesma quantidade de solução salina estéril (0,9%). Vinte e quatro horas após a administração i.n. de LPS ou salina estéril (0,9%), os animais foram previamente analgesiados com Xilasina (40mg/kg i.p.) em seguida anestesiados com Ketamina (50mg/kg, i.p.). Após a confirmação do plano anestésico, cada animal foi posicionado na mesa cirúrgica, onde foi realizada uma pequena incisão longitudinal na região anterior do pescoço do animal. Os tecidos adjacentes foram divulsionados e abatidos até que a traquéia ficasse exposta, quando então se realizou uma incisão transversal entre dois anéis fibrosos para que se pudesse introduzir uma cânula de traqueostomia para coleta do lavado broncoalveolar (LBA). Em seguida realizou-se 3 lavagens sucessivas com

0,5 ml de solução tampão fosfato (PBS), totalizando 1,5ml. Do volume recuperado (aprox. 1 ml) do LBA, 20 µl de cada amostra foi utilizado para contagem total de células inflamatórias, os quais foram diluídos em 380 µl de solução de Turk (0,2% de cristal de violeta em 30% de ácido acético), para determinar o número total de células presentes, sendo a contagem feita em câmara de Neubauer, através do emprego de um microscópio óptico Nikon® OLYMPYS CH30 sob aumento de 400 vezes.

Análise estatística

Para todos os dados obtidos foram realizados cálculos de média e erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste de variância ANOVA com pós teste de TURKEY-KRAMER para comparação múltipla onde foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

Na figura I podemos observar os resultados obtidos do experimento, e verificar a ação do LPS e/ou administração aguda dos flavonóides Rutina e Quercetina sobre a migração inflamatória no LBA de camundongos (contagem total). Observou-se que no grupo LPS houve aumento significativo da migração celular em relação ao grupo controle. Observamos também, que os grupos desafiados pelo LPS e tratados com hidrato de rutina (15 mg/kg), Dihidrato de quercetina (15 mg/kg) ou dexametasona (5 mg/kg i.p.), tiveram redução estatisticamente significativa do número de células totais no LBA em relação ao grupo LPS ($p < 0,001$). A dose escolhida dos flavonóides rutina e quercetina em vinte quatro horas apresentaram uma redução em relação ao grupo LPS de 34,33% e 36,31% respectivamente do número de células totais no LBA. A dexametasona reduziu em 65,67% o número de células totais no LBA.

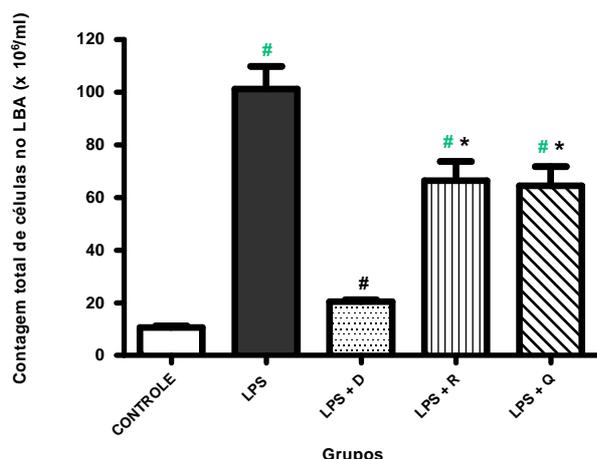


Figura 1: Contagem total de células no lavado broncoalveolar. Contagem total de células presentes no lavado broncoalveolar após 24 horas da instilação do LPS e tratados com salina (Controle e LPS) e tratados com Dexametasona (LPS+D), Rutina (LPS+R) e Quercetina (LPS+Q). Os dados representam a MÉDIA±EPM, n=7, # p<0,001 quando comparados com o grupo controle; # < p 0,001 e * p<0,01 quando comparado com o grupo LPS.

Discussão

O trato respiratório é o principal órgão que funciona como porta de entrada no corpo para poluentes inalados, que consequentemente será encaminhado até o pulmão. Dependendo da toxicidade e da natureza do poluente, a interação com as células do trato respiratório poderá desencadear uma resposta inflamatória (HANDERSON, 2005).

A resposta inflamatória endógena do organismo após a exposição às endotoxinas promove alterações diretas e indiretas nas células, causando lesões, alterando suas funções, liberando ou ativando a cascata de mediadores inflamatórios (D'ACAMPORA, 2004). Estes mediadores liberados no fluido epitelial de revestimento podem ser detectados no lavado broncoalveolar, que contera indicadores citológicos em resposta celular ao poluente inalado (HOFFMAN, 2008).

O modelo animal induzido pela administração de LPS pela via intranasal (i.n.) para estudos de inflamação tem demonstrado uma resposta de influxo de células inflamatórias nos espaços aéreos com pico variando entre 8 a 36 horas após indução (RYDELL-TORMANEN; ULLER; ERJEFALT, 2006).

Estes achados são descritos também no processo de inflamação crônica, conforme relatado por Douwes e colaboradores (2002), os quais observaram um padrão de

hiperresponsividade das vias aéreas caracterizadas por um maciço recrutamento de leucócitos em LBA. Corroborando desta forma com os resultados encontrados neste trabalho o qual apresentou um padrão de resposta característico de uma exacerbação severa, devido o elevado nível de leucócitos encontrados após 24 horas da instilação de LPS.

No Brasil tem se tornado comum as pesquisas utilizando produtos naturais, sejam eles provenientes de fitoterápicos ou compostos isolados de uma determinada planta medicinal. Relaciona as espécies vegetais ou seus constituintes com as atividades antiinflamatórias, antimicrobiana, antitumoral, analgésica e citotóxica, proporcionando muitas vezes alívio de sintomas comparável àquele obtido com medicamentos alopáticos (HOLETZ, 2002).

A maioria dos fármacos clinicamente significativos possui ação poderosa para o tratamento de várias doenças inflamatórias, como os corticóides, porém esta classe de fármacos apresenta vários e severos efeitos adversos (ARENDE et al., 2006).

Embora a utilização de produtos naturais seja uma prática comum, ainda se faz necessário a realização de um maior número de estudos científicos para testar sua eficácia e limitações. Além de avaliar os efeitos farmacológicos de extratos brutos vegetais, como uma estratégia de pesquisa para a busca de novas moléculas (ORTHOLAND; GANESAN, 2004).

Martinez e colaboradores (2008) investigaram a ação do flavonóide quercetina na inflamação e fibrose pulmonar induzida por bleomicina e concluíram que a quercetina exibiu efeitos antiinflamatórios e correlacionaram parte deste feito, pelas suas propriedades oxidantes. Do mesmo modo, PARK e sua equipe (2008), numa universidade da Coréia, analisaram a ação de seis flavonóides em doença alérgica, entre eles a rutina e quercetina, e sugeriram que dentre as ações farmacológicas destes flavonóides estavam a ação antiinflamatória e este mecanismo ocorreu devido a regulação da ativação dos mastócitos.

Em nosso estudo, encontramos reduções na quantidade de células encontradas após 24 horas da indução do processo inflamatório, quando tratados com a rutina e quercetina, porém a redução obtida foi metade da resposta com o tratamento de corticóide, que como já descrito possui ação efetiva no processo inflamatório e antialérgico, pois promove bloqueio precoce dos eventos da cascata da inflamação. Porém não podemos deixar de citar que do mesmo modo que o corticóide apresenta sucesso no tratamento, juntamente apresenta diversos efeitos colaterais não desejáveis. Enquanto os flavonóides não possuem este efeito, pois estas substâncias são

frequentemente encontradas em produtos naturais, como plantas, flores, vegetais e frutas.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo mostram que os flavonóides isolados rutina e quercetina possuem constituintes ativos com atividades antiinflamatórias, e reduziu de forma significativa a inflamação pulmonar induzida pelo LPS.

Diante deste resultado sugere-se que ambos os flavonóides podem ser considerados um potencial terapêutico no tratamento de inflamação pulmonar e ainda, indica-se que futuramente seja realizado novos experimentos, utilizando doses maiores, com o intuito de aproximar ou igualar ao resultado obtido com a ação de corticóide, com a vantagem de não apresentar as mesmas reações adversas deste fármaco sintético.

Referências

- DALCIN P. T. R., PERIN C. Manejo da asma aguda em adultos na sala de emergência: Evidências atuais. **Rev Assoc Med Bras.** V. 55 n.1, p. 82-8, 2009.
- BRANDAO H. V. et al. Hospitalizações por asma: impacto de um programa de controle de asma e rinite alérgica em Feira de Santana (BA). **J Bras Pneumol.** V.35, n.8, p.723-729, 2009.
- POBER J. S.; SESSA W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat. rev. immunol.** V.10, n.7, p. 803-815, 2007.
- CORRÊA M.F.P.; MELO G.O.; COSTA S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** V.18, p.785-797, 2008.
- OLIVEIRA T. T.; SILVA R. R.; DORNAS W. C.; NAGEM T. J. flavonoids and atherosclerosis. **RBAC** V.42, n.1, p.49-54, 2010.
- GUARDIA T.; ROTELLI A. E.; JUAREZ A. O. PELZER L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Farmaco** V.56, n.9, p.683-687, 2001.
- HERNDERSON, R.F. Use of Bronchoalveolar lavezge to detect respiratory tract toxicity of inhaled material. **Exp Toxicol Pathol.** V.57, n.1, p.155-159, 2005.
- D'ACAMPORA A. J. et al. Efeitos da castração pós natal sobre o tecido pulmonar após sepse experimental de origem abdominal em ratos. **Acta Cir Bras.** V.19, n.2, p.115-119, 2004.
- HOFFMAN A. M. Bronchoalveolar lavezge:sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.** V.24, n.2, p.423-435, 2008.
- RYDELL-TORMANEN K.; ULLER L. ERJEFALT J. S. Direct evidence of secondary necrosis of neutrophils during intense lung inflammation. **Eur. Respir. J.** V.28, n.2, p.268-274, 2006.
- DOUWES J. et al. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. **Thorax.** V.57, n.7, p.642-648, 2002.
- HOLETZ F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** V.97, n.7, p.1027-1031, 2002.
- AREND E. E.; FISCHER G. B.; DEBIAS M.; SCHMID H. Inhaled corticosteroid treatment and growth of asthmatic children seen at outpatient clinics. **J Pediatr.** V.82, n.3, p.197-203, 2006.
- ORTHOLAND J.Y. GANESAN A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Curr. Opin. Chem. Biol.,** V.8, p.271-280, 2004.
- MARTINEZ J. A. B. et al. Effects of quercetin on bleomycin-induced lung injury: a preliminary study. **J. Bras Pneumol.,** V.34, n.7, p.445-452, 2008.
- PARK H.H. et al. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. **Pharm. Res. Arch.** V.31, n.10, p.1303-1311, 2008.

XIV INIC

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

X EPG

Encontro Latino Americano
de Pós Graduação

IV INIC Jr

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior