

AVALIAÇÃO IN VITRO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS COM O USO DE NUTRACÊUTICO PARA ARTICULAÇÕES DE CAES

HILANA DOS SANTOS SENA BRUNEL, PATRICIA FURTADO MALARDANDRÊSSA ARAÚJO

BioInnova Testes e Soluções Biomoleculares – Laboratório de testes *in vitro*

Contato: hilana@bioinnova.com.br / Apresentador: HILANA DOS SANTOS SENA BRUNEL

Resumo: A osteoatrose é uma afecção de intensa abrangência na área pet. O tratamento dessa enfermidade é multifatorial e pode incluir o uso de nutracêuticos. Uma estratégia que tem sido usada para avaliar a eficácia de produtos tem sido os testes *in vitro*. No presente estudo, os mediadores inflamatórios articulares (IL17A e IL6) foram avaliados em cultivo de células induzidas a se diferenciarem em condrócitos quando em contato com o nutracêutico testado. As citocinas pró-inflamatórias foram dosadas por espectrofotometria com kits comerciais e apresentaram diminuição quando em contato com o produto. IL17A é um importante marcador em processos inflamatórios articulares e regula a IL6, citocina também atuante no processo de degradação articular. Os níveis aumentados de IL17A e IL6 induzem uma infinidade de fatores que contribuem para a degradação da cartilagem articular e erosão do osso subjacente; a diminuição dessas citocinas causada pelo produto é um resultado que pode significar a ação anti-inflamatória articular. Dessa forma, o presente estudo mostrou a eficácia anti-inflamatória *in vitro* do nutracêutico em cultivo de células.

PalavrasChaves: anti-inflamatório, degradação articular, testes *in vitro*.

IN VITRO EVALUATION OF INFLAMMATORY MEDIATORS WITH THE USE OF NUTRACEUTICALS FOR DOGS` JOINTS

Abstract: Osteoarthritis is a disease of intense incidence in the pet area. The treatment of this disease is multifactorial and may include the use of nutraceuticals. One strategy that has been used to evaluate the effectiveness of products has been *in vitro* tests. In the present study, joint inflammatory mediators (IL17A and IL6) were evaluated in culture of cells induced to differentiate into chondrocytes when in contact with the nutraceutical. Pro-inflammatory cytokines were measured by spectrophotometry with commercial kits and showed a decrease when in contact with the product. IL17A is an important marker in joint inflammatory processes and regulates IL6, a cytokine also active in the process of joint degradation. Increased levels of IL17A and IL6 induce a myriad of factors that contribute to articular cartilage degradation and underlying bone erosion; the decrease in these cytokines caused by the product is a result that could mean joint anti-inflammatory action. Thus, the present study showed the *in vitro* anti-inflammatory efficacy of the nutraceutical in cell culture.

Keywords: anti-inflammatory, joint degradation, *in vitro* tests.

Introdução: A osteoartrose é uma doença caracterizada pela degeneração progressiva e remodelação das articulações sinoviais causando dor e claudicação (Alam et al., 2011). Após a identificação da doença existem diferentes abordagens que podem ser utilizadas para o tratamento, uma delas é o uso de estratégias não farmacológicas entre elas, o uso de suplementos dietéticos, os nutracêuticos, que contém diversos ingredientes naturais. A membrana da casca do ovo (NEM®) é uma fonte natural de componentes imunomoduladores e a aplicação desse suplemento em conjunto com outros auxiliares no tratamento para função articular em cães tem sido estudada (K. Ruff et al., 2016). Com base nisso, esse trabalho se propôs avaliar a ação *in vitro* de um nutracêutico (MOVE® da Pearson Saúde Animal) que tem como princípio ativo o NEM®, além de colágeno tipo II e bisglicinato de manganês sobre células-tronco mesenquimais de cães. As análises envolveram a dosagem de citocinas envolvidas no processo inflamatório articular.

Material e Métodos: O estudo foi realizado com o cultivo de células-tronco mesenquimais caninas, as quais foram induzidas à diferenciação em tecido cartilaginoso. As células foram descongeladas e cultivadas em meio de cultivo DMEM-Low Glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – suplementado com antibiótico/antimicótico e soro fetal bovino (SFB) em placas de 12 poços. Após 48 horas do cultivo, o meio foi trocado por meio composto por 10% de meio de diferenciação + 90% de meio de cultivo com 0,1% do nutracêutico. A troca do meio foi realizada a cada 2-3 dias até que as células se diferenciasssem. Após 23 dias em cultivo com o meio de indução à diferenciação e o produto, as células se diferenciaram em células do tecido cartilaginoso. O sobrenadante do cultivo celular foi coletado e congelado para posterior dosagem de citocinas. Dessa forma, durante o processo de transformação das células-tronco em condrócitos, foi feito o tratamento delas com o nutracêutico, seguido de coleta do sobrenadante do cultivo celular e dosagem de citocinas inflamatórias (IL17A e IL6). Os marcadores de inflamação IL17A e IL6 foram dosados utilizando kits comerciais por espectrofotometria, os valores foram dispostos em tabela e foi feita a comparação entre as dosagens obtidas com e sem o produto em meio de cultivo. Os valores foram analisados pelo teste T de Student com significância de 0,05% usando o programa estatístico GraphPad Prism® 7.04.

Resultado e Discussão: Foi possível observar que o nutracêutico causou a diminuição da citocina IL17A que é um importante marcador em processos inflamatórios articulares (Figura 1). A IL17A é conhecida por promover a regulação positiva dos níveis de óxido nítrico (NO) na cartilagem. Quando os níveis de NO aumentam, pode ocorrer destruição da matriz extracelular e danos aos condrócitos, o que consequentemente contribui para uma redução global da função articular. Esses níveis aumentados de IL-17A induzem uma infinidade de fatores que contribuem para a degradação da cartilagem articular e erosão do osso subjacente. Ainda, a interleucina-17A regula positivamente o óxido nítrico (NO) na cartilagem osteoartrítica e o aumento dos níveis de NO podem levar à destruição da matriz extracelular e danos aos condrócitos, contribuindo para a redução global da função articular. Ainda, a interleucina-17A atua aumentando os efeitos destrutivos da

IL-1beta e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alpha) na cartilagem, sinóvia e menisco. A interleucina-17A regula a IL-6, que é uma potente mediadora de inflamação nas articulações, sendo conhecida por contribuir para a degradação global da cartilagem nos processos de artrites. No presente estudo, foi observada uma diminuição nos níveis de IL6 (Figura 1) conforme esperado, já que essa citocina é regulada pela IL17A. Esse resultado reforça o possível papel anti-inflamatório do nutracêutico, já que a IL6 é responsável por atuar na degradação da cartilagem e erosão do osso subjacente.

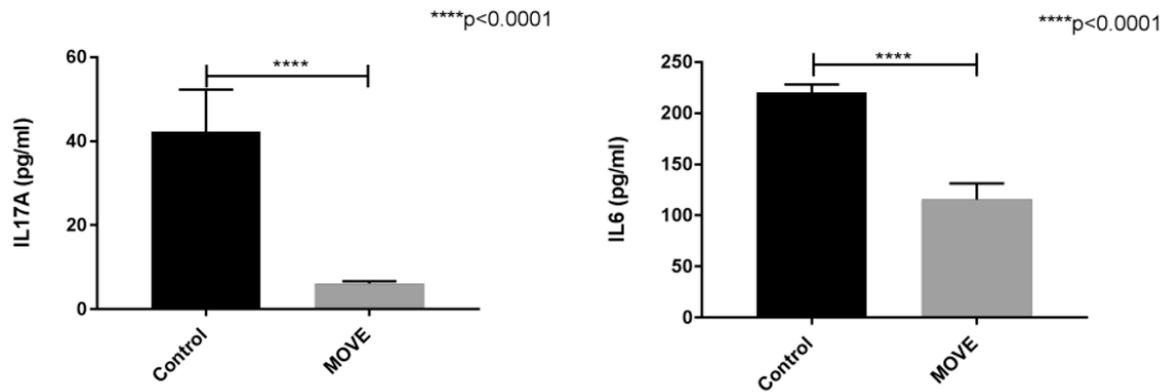


Figura 1 Dosagem dos níveis de IL17A e IL6 em células tronco mesenquimais após o tratamento com o nutracêutico. Controle: grupo que não recebeu o tratamento.

Conclusão: Os ensaios mostraram a eficácia anti-inflamatória in vitro do nutracêutico em células. Essa atividade pode ser atribuída ao NEM®, manganês e o magnésio, compostos que podem auxiliar na diminuição de marcadores inflamatórios. O colágeno, também presente no nutracêutico estudado, ao ser combinado com o NEM® é capaz de agir reduzindo a degradação das cartilagens, além de prevenir a inflamação local.

Referências Bibliográficas: Kovacs-Nolan, J., Cordeiro, C., Young, D., Mine, Y., & Hincke, M. (2014). Ovocalyxin-36 is an effector protein modulating the production of proinflammatory mediators. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 160(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.03.005>Ruff, K. J., Morrison, D., Duncan, S. A., Back, M., Aydogan, C., & Theodosakis, J. (2018). Beneficial effects of natural eggshell membrane versus placebo in exercise-induced joint pain, stiffness, and cartilage turnover in healthy, postmenopausal women. *Clinical Interventions in Aging*, Volume 13, 285–295. <https://doi.org/10.2147/CIA.S153782>Ruff, K. J., Winkler, A., Jackson, R. W., DeVore, D. P., & Ritz, B. W. (2009). Eggshell membrane in the treatment of pain and stiffness from osteoarthritis of the knee: a randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Clinical Rheumatology*, 28(8), 907–914. <https://doi.org/10.1007/s10067-009-1173-4>Ruff, K., Kopp, K., Von Behrens, P., Lux, M., Mahn, M., & Back, M. (2016). Effectiveness of NEM® brand eggshell membrane in the treatment of suboptimal joint function in dogs: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, Volume 7, 113–121. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S101842>