

## EFEITOS DO BETA-MIRCENO SOBRE O RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS E FORMAÇÃO DE EDEMA NO MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS.

Guilherme Henrique Oliveira Silva (PIC), Roberto Kenji Nakamura Cuman (Coorientador), Francielli Maria de Souza Silva Comar (Orientador), e-mail: guirick123@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro Ciências da Saúde / Maringá, PR.

**Área e subárea do CNPq/CAPES:** Farmacologia.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -mirceno; lesão pulmonar aguda; migração celular.

### Resumo

O  $\beta$ -mirceno é um derivado de óleos essenciais pertencente a classe dos terpenos, e apresenta diversas propriedades farmacológicas, dentre estas ação anti-inflamatória. O  $\beta$ -mirceno reduziu a migração celular, a produção de NO e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) no modelo de pleurisia induzida por LPS. O objetivo do estudo foi padronizar o modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS e avaliar os efeitos do pré-tratamento com  $\beta$ -mirceno sobre a migração celular e edema pulmonar em camundongos com LPA induzida por LPS. Os resultados encontrados mostram que o LPS administrado via intranasal na dose de 5 mg/Kg aumentou significativamente o número de leucócitos totais no LBA, o que confirma a viabilidade do modelo experimental de lesão pulmonar aguda. O pré-tratamento via oral com  $\beta$ -mirceno nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg mostrou-se eficaz em reduzir a migração de leucócitos totais e polimorfonucleares (PMN) no LBA. Adicionalmente, o  $\beta$ -mirceno (125 e 250 mg/kg) diminuiu notavelmente a magnitude do edema pulmonar avaliado pela razão peso úmido/seco do pulmão. Em conclusão, nossos resultados demonstram que o  $\beta$ -mirceno apresenta efeito anti-inflamatório no referido modelo experimental como demonstrado pela inibição no recrutamento de leucócitos e na magnitude do edema pulmonar.

### Introdução

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma síndrome de insuficiência respiratória, caracterizada por uma infiltração pulmonar bilateral e difusa, formação de edema pulmonar e hipoxemia grave. Nesta, há uma intensa resposta inflamatória, caracterizada por recrutamento de neutrófilos, edema e ruptura do epitélio com lesão do parênquima pulmonar (Grommes & Soehnlein, 2011).

A LPA induzida por LPS em camundongos se assemelha com a LPA humana, pelo fato de aumentar a permeabilidade capilar, promover a formação de edema pulmonar e desencadear o influxo de células inflamatórias (Matthay et al., 2012). Esses efeitos podem ser observados quando se utiliza a via inalatória ou sistêmica por um curto intervalo de tempo (inferior a 48 horas). De forma geral, o LPS provoca as principais características da LPA em camundongos após vinte e quatro horas da administração intranasal ou intratraqueal.

O  $\beta$ -mirceno é um monoterpene de aroma agradável, considerado o principal componente do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Possui grande utilização na indústria cosmética, alimentícia. Este terpeno, apresenta diversas propriedades farmacológicas importantes, tais qual, efeito analgésico, antioxidante, sedativo, atividade antimicrobiana entre outras (Matute-Bello et al., 2008).

Diante do exposto acima, objetivo geral deste projeto foi padronizar a técnica de LPA induzida por LPS e avaliar as ações do  $\beta$ -mirceno sobre a migração de leucócitos no lavado bronco alveolar e a formação do edema pulmonar.

## **Materiais e métodos**

Camundongos Balb-c, pesando de 20-25g, foram divididos aleatoriamente em sete grupos (n= 7-10): controle, LPS, LPS +  $\beta$ -mirceno (125, 250 ou 500mg/kg), LPS + zafirlucaste (ZAF 5 mg/kg, antagonista dos receptores de leucotrienos) ou LPS + dexametasona (DEX, 1 mg / kg, droga anti-inflamatória padrão).  $\beta$ -mirceno ZAF e DEX foram administrados via oral. Os animais dos grupos controles e LPS receberam igual volume de solução fisiológica. Após uma hora de tratamento, os grupos foram submetidos a anestesia com xilazina e cetamina e receberam a administração por via intranasal de 40  $\mu$ L de solução de LPS (5 mg/Kg).

Vinte e quatro horas após a administração do LPS, os animais foram eutanasiados com overdose anestésica e uma cânula traqueal foi inserida via incisão médio-cervical para a coleta do LBA, que foi utilizado para a contagem total e diferencial de células.

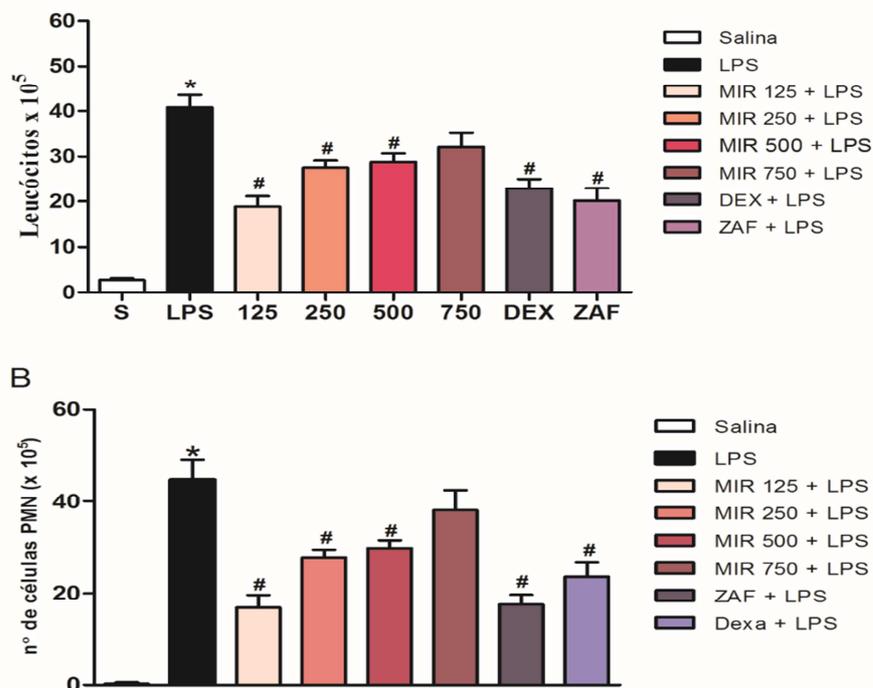
Para avaliar o edema pulmonar, vinte e quatro horas após a indução da LPA, os animais foram eutanasiados, tiveram seus pulmões retirados e pesados. Em seguida, os pulmões foram colocados em uma estufa a 80°C por 24 horas, e após esse período, os pulmões secos foram pesados. A razão do pulmão úmido para pulmão seco foi calculada, sendo importante para a avaliação do edema pulmonar.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## Resultados e Discussão

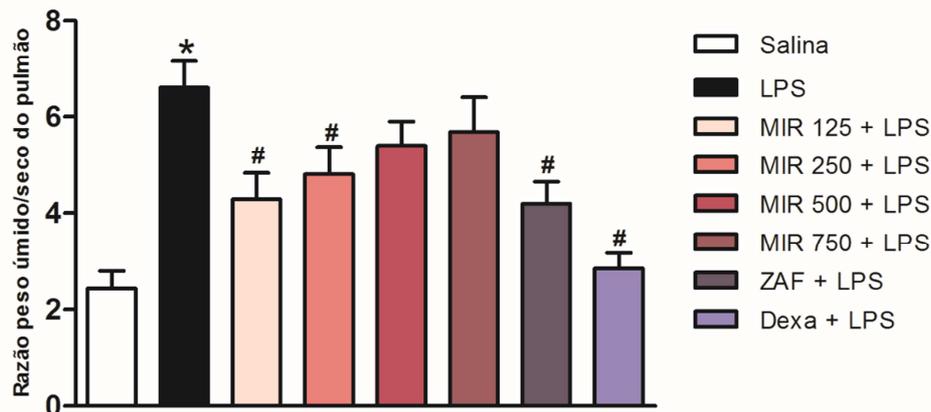
Os animais do grupo LPS apresentaram aumento significativo do número de leucócitos totais no LBA quando comparados aos animais do grupo controle, indicando que o desafio com LPS (i.n. 5 mg/kg) promoveu a migração de células para essa região, confirmando a viabilidade do modelo experimental de lesão pulmonar aguda. O pré-tratamento via oral com  $\beta$ -mirceno nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg levou a redução dessa migração (Figura 1A) quando comparado ao grupo LPS. Resultado semelhante foi encontrado nos grupos tratados com ZAF (antagonista dos receptores de leucotrienos) e DEX (droga anti-inflamatória padrão).

Em relação a análise das células diferenciais, foi observado que o número aumentado de leucócitos no LBA dos animais desafiados com LPS está relacionado com a migração de células PMN, e que a diminuição desse número após o tratamento com  $\beta$ -mirceno é atribuída a inibição da migração de células PMN (Figura 1B). Tendo em vista que, após o tratamento com  $\beta$ -mirceno (125, 250 e 500 mg/kg) houve redução significativa no número de células PMN no LBA. Resultados semelhantes foram observados nos animais tratados com ZAF e DEX



**Figura 1.** Efeito do tratamento com  $\beta$ -mirceno na migração celular no modelo de LPA induzida por LPS. (A) Número de células totais no LBA; (B) Número de células PMN no LBA. Os valores foram expressos com média  $\pm$ EPM. \*P < 0.01 quando comparado ao grupo controle, #P < 0.01 comparado com grupo LPS.

Como mostrado na Figura 2, o desafio com LPS aumentou significativamente a relação peso úmido/seco do pulmão em comparação com o grupo controle. O pré-tratamento via oral com  $\beta$ -mirceno nas doses de 125 e 250 mg/kg diminuiu notavelmente a magnitude do edema pulmonar quando comparado com o grupo LPS.



**Figura 2.** Efeito do pré-tratamento com mirceno no edema pulmonar. Os valores foram expressos com média  $\pm$ EPM. \*P < 0.01 quando comparado ao grupo controle, #P < 0.01 comparado com grupo LPS

## Conclusão

Os dados obtidos nesse estudo demonstram que  $\beta$ -mirceno possui efeito anti-inflamatório no referido modelo, por atenuar a migração de células no LBA e reduzir a magnitude do edema pulmonar

## Referências

- GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury. *Journal of Molecular Medicine*, vol.17, pp.293 - 307, 2011..
- MATTHAY, M. A.; WARE, L. B.; ZIMMERMAN, G. A. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest.*, vol. 122, no. 08, pp. 2731-2740, 2012.
- MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell MolPhysiol*, vol. 295, pp. 379–399, 2008.