

## EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM BETA-MIRCENO SOBRE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA PELA INSTILAÇÃO INTRANASAL DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

Isabela Kirach Gaio (PIC/CNPq/FA/UEM), Roberto Kenji Nakamura Cuman (Coorientador), Francielli Maria de Souza da Silva Comar (Orientador), e-mail: franciellimss@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro Ciências da Saúde / Departamento de Farmacologia e Terapêutica / Maringá, PR.

**Área: Farmácia / Subárea: Farmácia / Análise Toxicológica**

**Palavras-chave:** Beta-mirceno, lesão pulmonar aguda, enzima mieloperoxidase

### Resumo

A LPA induzida por LPS é um modelo de inflamação pulmonar em camundongos, a qual apresenta muitas semelhanças com a LPA humana. A indução da LPA é feita pela administração intranasal ou intratraqueal de LPS, que nos pulmões desencadeia uma forte resposta inflamatória com ativação de fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e aumentos nos níveis de citocinas e enzimas pró-inflamatórias, como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a ciclooxigenase-2 (COX-2). O  $\beta$ -mirceno é um terpeno que apresenta propriedades farmacológicas bem documentadas na literatura, tais como anti-inflamatória. Sendo assim, esse estudo objetivou avaliar os efeitos do pré-tratamento com beta-mirceno sobre a LPA induzida por LPS em camundongos. Especificamente foram avaliados os níveis de óxido nítrico (NO) e a dosagem de proteínas totais no LBA, e a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar. A administração intranasal de LPS aumentou significativamente os níveis de NO, o extravasamento de proteínas e a atividade da MPO. O pré-tratamento com  $\beta$ -mirceno (125 250 e 500 mg/kg) reduziu de forma significativa os níveis de NO e a atividade da MPO. O extravasamento de proteínas foi diminuído após o tratamento com  $\beta$ -mirceno nas doses de 125 250 mg/kg. Os resultados obtidos revelaram que o  $\beta$  -mirceno possui atividade anti-inflamatória no referido modelo.

### Introdução

A LPA é uma síndrome de insuficiência respiratória de instalação aguda com uma taxa de mortalidade variando entre 29 e 42%. Sua fisiopatologia envolve uma intensa resposta inflamatória pulmonar, que é caracterizada por recrutamento de neutrófilos, edema e ruptura do epitélio com lesão do parênquima pulmonar.

A LPA induzida por LPS é um modelo de inflamação pulmonar aguda em camundongos que apresenta muitas semelhanças com a LPA humana (Matthay et

al., 2012). A ativação da resposta inflamatória ao LPS ocorre via receptor Toll like 4 (TRL4) nas células hospedeiras. A ligação do LPS ao TRL4 resulta na ativação de uma cascata de sinalização que termina em ativar o NF- $\kappa$ B. A ativação de NF- $\kappa$ B aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 e a transcrição de algumas enzimas também pró-inflamatórias, como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a ciclooxigenase-2 (COX-2). A excessiva produção de óxido nítrico (NO) via iNOS acentua o processo inflamatório agravando assim a LPA (Forstermann & Sessa, 2012).

O  $\beta$ -mirceno é um monoterpene, proveniente de óleos essenciais de muitas plantas. Em relação à sua ação anti-inflamatória, estudos conduzidos em modelo de pleurisia induzida por LPS em ratos demonstraram que o  $\beta$ -mirceno reduz a migração celular, a produção de NO, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-4 em exsudato pleural (Souza et al., 2003). Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos do  $\beta$ -mirceno sobre LPA induzida por LPS em camundongos. Especificamente foram avaliados os níveis de NO e a dosagem de proteínas totais no LBA, e a atividade da enzima MPO no tecido pulmonar.

## Materiais e métodos

Camundongos Swiss foram divididos aleatoriamente em oito grupos (n= 7-10): controle, LPS, LPS +  $\beta$ -mirceno (125, 250, 500 ou 750 mg/kg), LPS + zafirlucaste (ZAR 5 mg/kg, antagonista dos receptores de leucotrienos) ou LPS + dexametasona (DEX, 1 mg / kg).  $\beta$ -mirceno, ZAR e DEX foram administrados via oral. Uma hora após o tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina e quantenta  $\mu$ L de solução de LPS (5 mg/Kg) foi administrado por via intranasal nos camundongos para induzir a lesão pulmonar.

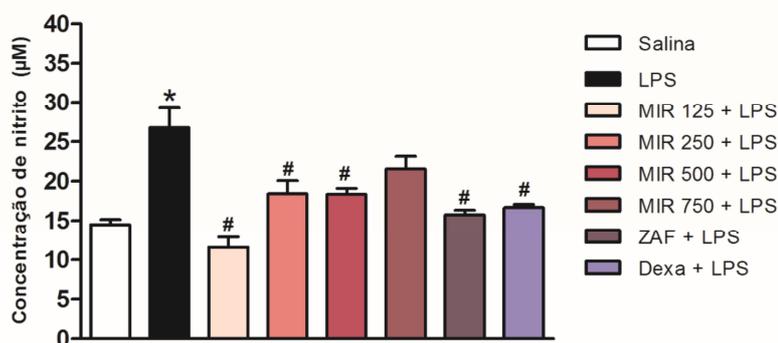
Vinte e quatro horas após a administração do LPS, os animais foram eutanasiados com overdose anestésica e uma cânula traqueal foi inserida via incisão médio-cervical. Os pulmões foram lavados três vezes com 0,5 mL de tampão fosfato (PBS, pH 7,4 a 4°C) num volume total de 1.5 mL. O lavado broncoalveolar (LBA) foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e utilizado para a dosagem dos níveis de NO (por meio da reação de Griess) e dosagem de proteína total (kit Gold Analisa®).

O acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar foi avaliada pela atividade da enzima MPO. Vinte e quatro horas após a administração do LPS, os animais foram eutanasiados e tiveram seus pulmões retirados. Amostras de tecidos pulmonares juntamente com tampão fosfato de potássio foram homogeneizadas, centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de MPO. A atividade da enzima foi determinada pela técnica de ponto final através da medida de absorbância (460 nm).

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  $p < 0,05$  serão considerados estatisticamente significativo.

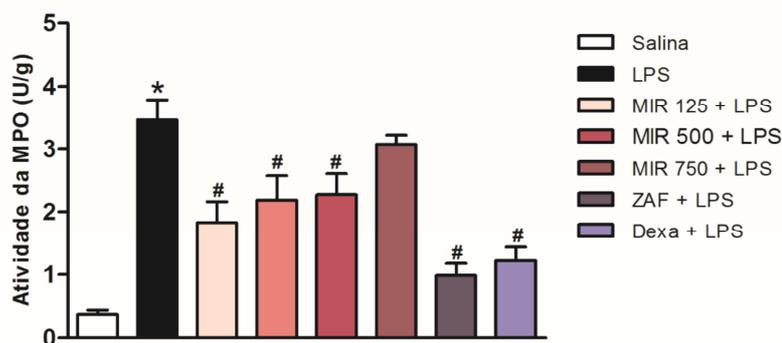
## Resultados e Discussão

O nível de produção de NO foi monitorizado medindo o nível de nitrito no LBA por meio de reação de Griess. A administração intranasal de LPS aumentou significativamente os níveis de NO no LBA (Figura 1). Nos animais pré-tratados com  $\beta$ -mirceno, nas doses de 125 250 e 500 mg/kg, os níveis de NO no LBA foram significativamente reduzidos em 56,72; 31,16 e 31,42%, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados nos animais tratados com Zafirlucaste e Dexametasona.



**Figura 1.** Efeito do pré-tratamento com  $\beta$ -mirceno nos níveis de óxido nítrico 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

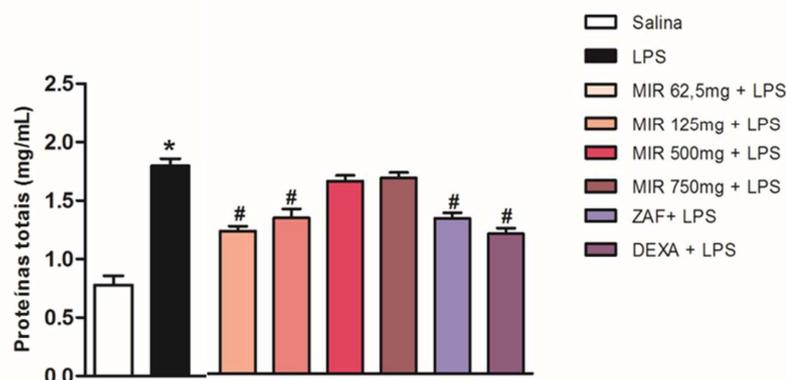
A acumulação de neutrófilos no tecido pulmonar foi avaliada pela atividade da enzima MPO. Como pode ser observado na figura 2, o nível de atividade da MPO aumentou após a administração do LPS. O pré-tratamento com  $\beta$ -mirceno (125, 250 e 500 mg/kg) reduziu significativamente a atividade da MPO em comparação ao grupo LPS. Resultados semelhantes foram encontrados nos grupos tratados com ZAF e DEX. Esses dados sugerem que o  $\beta$ -mirceno possui efeito anti-inflamatório na atenuação da migração de neutrófilos nos pulmões.



**Figura 2.** Efeito do pré-tratamento com  $\beta$ -mirceno na atividade da enzima MPO. Os valores foram expressos com média  $\pm$ EPM. \*P < 0.01 quando comparado ao grupo controle, #P < 0.01 comparado com grupo LPS

Como pode ser observado na figura 3, houve extravasamento significativo de proteínas para a região broncoalveolar após a administração intranasal de LPS em comparação com o grupo controle (salina). O pré-tratamento via oral com  $\beta$ -mirceno nas doses de 125 e 250 mg/kg reduziu o extravasamento de proteínas quando

comparado com o grupo LPS. Resultados semelhantes foram encontrados nos animais tratados com ZAF e DEXA.



**Figura 3.** Efeito do pré-tratamento com mirceno no influxo de proteínas para a região broncoalveolar. Os valores foram expressos com média  $\pm$ EPM. \*P < 0.01 quando comparado ao grupo controle, #P < 0.01 comparado com grupo LPS

## Conclusões

Os resultados obtidos revelaram que o  $\beta$ -mirceno possui propriedades anti-inflamatórias bastante significativas no tratamento da LPA induzida por LPS, por reduzir a atividade da enzima MPO, os níveis de óxido nítrico e o extravasamento de proteínas no LBA.

## Agradecimentos

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## Referências

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, vol. 33, pp.829–37, 2012.

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.

SOUZA, M. C.; SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; MENEZES-DE-LIMA JR, O.; HENRIQUES, M. G. M. O. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. **Pharmazie**, vol. 58, pp. 582–586, 2003.