

EFEITOS DO BETA-MIRCENO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO NO MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO

Guilherme Henrique Oliveira Silva (PIBIC-CNPq), Francielli Maria de Souza Silva Comar (Co-orientadora), Roberto Kenji Nakamura Cuman (Orientador), e-mail: rkncuman@uem.br

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

Área e sub-área do conhecimento: Farmácia – Análise toxicológica.

Palavras-chave: β -mirceno; estresse oxidativo; inflamação pulmonar.

Resumo:

A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) é uma síndrome de insuficiência respiratória que é caracterizada por infiltração pulmonar, edema e hipoxemia grave. A indução da LPA é feita pela administração intranasal de LPS, que nos pulmões causa uma forte resposta inflamatória. O β -mirceno é um terpeno derivado de óleos essenciais que apresenta diversas propriedades farmacológicas, incluindo propriedades anti-inflamatórias. Neste estudo, demonstra que o tratamento com β -mirceno nas doses de 500 e 750 mg/kg atenuou o processo inflamatório no pulmão, reduzindo a migração de neutrófilos para o tecido, sendo evidenciado pela diminuição nos níveis da enzima Mieloperoxidase (MPO). Outrossim, o terpeno mostrou eficácia na redução do estresse oxidativo pulmonar, evidenciado pela diminuição do nível de proteínas carboniladas e elevação dos níveis de GSH. Portanto, pode-se concluir que o β -mirceno apresenta atividade anti-inflamatória, no modelo utilizado, pois acarretou na atenuação da migração de neutrófilos para os pulmões e diminuição do estresse oxidativo.

Introdução

O desenvolvimento da LPA está associado a diversos fatores de risco, como pneumonia, traumas, sepse, pancreatite e choque. A fisiopatologia da lesão envolve uma intensa resposta inflamatória pulmonar, que é caracterizada por recrutamento de neutrófilos e ativação de macrófagos alveolares, os quais secretam citocinas, principalmente IL-1, IL-6, IL-8, e IL-10 e TNF- α . Adicionalmente, os neutrófilos e macrófagos ativados também produzem e secretam outros mediadores inflamatórios que lesam diretamente o epitélio alveolar, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases (BERNARD et al., 1994).

O β -mirceno, ou simplesmente mirceno, é um monoterpene acíclico de aroma agradável, proveniente de óleos essenciais de muitas plantas como, erva-cidreira, capim-limão, louro, verbena, lúpulo entre outros; sendo o principal componente do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). É um importante ingrediente usado na fabricação de cosméticos e aromatizantes utilizados na indústria

alimentícia, apresentando inúmeras atividades, dentre elas anti-inflamatória, analgésica e antioxidante (LORENZETTI et al., 1991; BONAMIN et al., 2014; CIFTCI et al., 2014).

Portanto, é possível que o β -mirceno possa ser uma alternativa eficaz para o tratamento da LPA em seres humanos. Entretanto, faz-se necessário uma confirmação direta da hipótese primária de que este monoterpene possa atuar como promissor agente anti-inflamatório. Com este propósito, faz-se necessário avaliar o efeito deste composto sobre modelos experimentais de LPA em animais, como a LPA induzida por LPS em camundongos.

Materiais e Métodos

Foram utilizados camundongos da linhagem Balb-C machos, pesando entre 20-25g. Estes foram divididos aleatoriamente em sete grupos (n= 7): controle, LPS, LPS + β -mirceno (125, 250 e 500 mg/Kg), LPS + zafirlucaste (ZAR 5 mg/kg, antagonista dos receptores de leucotrienos) ou LPS + dexametasona (DEX, 1 mg / kg). As drogas β -mirceno, ZAR e DEX foram administrados via oral. Para a lesão pulmonar aguda, os camundongos foram previamente anestesiados com cetamina e xilazina e em seguida foi realizada a administração intranasal de 50 μ L de uma solução de LPS (Sigma-Aldrich) (500 μ g/1mL). Os animais dos grupos Controle e LPS receberam igual volume de solução fisiológica.

Para o estresse oxidativo do tecido pulmonar, 24h após a administração intranasal de LPS realizou-se a eutanásia dos animais (por overdose anestésica), retirando os pulmões. Em seguida, foi preparado um homogenato com 0,5g de tecido pulmonar + 10 volumes de tampão fosfato de potássio 0,1M (p 7,4) e uma alíquota foi extraída para determinar o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e analisar a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

Para a análise estatística os resultados foram analisados utilizando o Software GraphPad Prism® (versão 5.0) sendo 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

Para a determinação do acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar avaliou-se a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), determinada pela técnica de ponto final através da medida de absorbância (460 nm) por meio de um leitor Spectra Max Plus e registrada em intervalos de 15 segundos durante 2 min. (Lionhert Diagnostics® - ELX 800). Conforme observado na Figura 1, o nível de atividade da MPO aumentou após a administração do LPS. Em contrapartida, os tratados com β -mirceno, nas doses 500 e 750 mg/kg, reduziram significativamente a atividade da MPO. Além disso, resultados semelhantes foram encontrados nos grupos tratados com ZAF e DEX. Com isso, sugere-se que o β -mirceno possui efeito anti-inflamatório na atenuação da migração de neutrófilos nos pulmões.

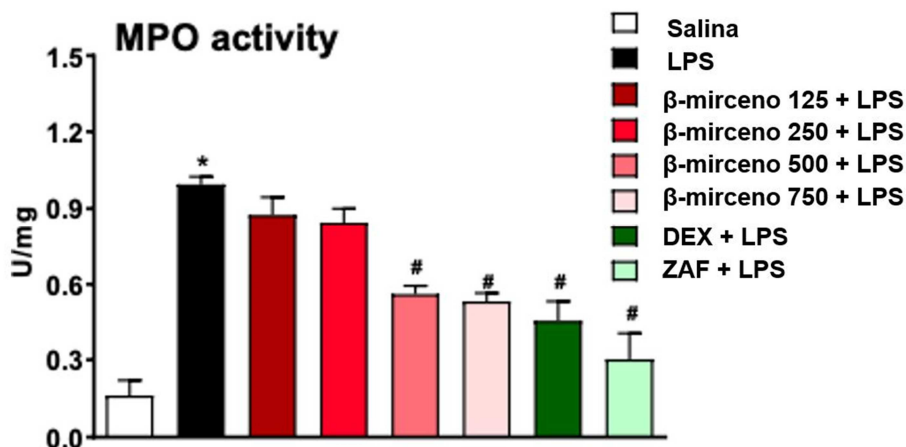
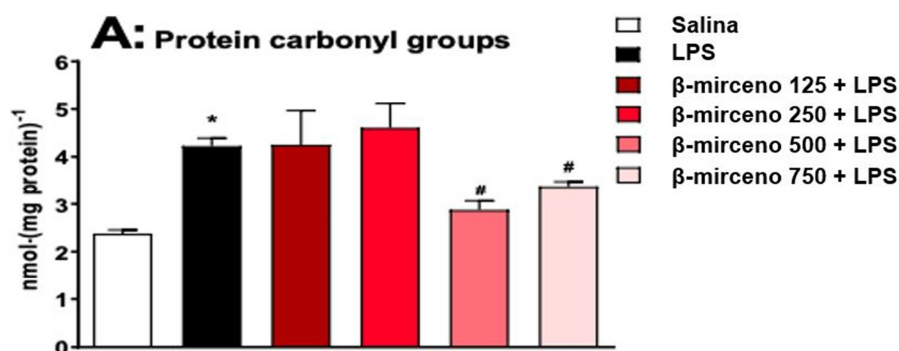


Figura 1 – Efeitos do β-mirceno sobre a atividade da MPO no tecido pulmonar. * $p < 0.05$ comparado com o grupo salina; # $p < 0.05$ comparado com o grupo LPS.

Para a determinação do estresse oxidativo pulmonar, analisou-se os níveis de proteínas carboniladas e GSH no tecido pulmonar. Para GSH, utilizou-se espectrofluorimetria, com excitação de 350 nm e emissão em 420 nm, por meio do ensaio com o-ftalaldeído (OPT). A fluorescência foi calculada como GSH. Os resultados foram calculados usando uma curva padrão preparada com GSH e os valores expressos em nmol (mg de proteína)⁻¹.

Conforme a Figura 2A, os níveis de grupos proteicos carbonil, um parâmetro pró-oxidativo, foram 60% maiores nos pulmões de camundongos do grupo LPS e o tratamento com 500 e 750 mg/kg de β-mirceno reduziu consideravelmente esses níveis. Os resultados de glutathiona reduzida (Figura 2B) estão diminuídos após a administração de LPS, em comparação com o tratamento de β-mirceno (125, 250, 500). Vale ressaltar que o tratamento de camundongos com β-mirceno 750 mg/kg praticamente restabeleceu os valores de controle e GSH.



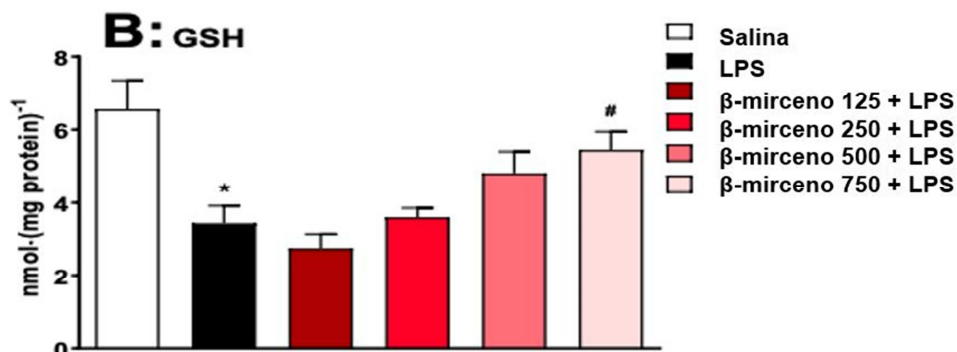


Figura 2 - Efeitos do β -mirceno sobre o estresse oxidativo no tecido pulmonar * $p < 0.05$ comparado com o grupo salina; # $p < 0.05$ comparado com o grupo LPS.

Conclusões

Levando em consideração a capacidade do composto β -mirceno de atenuar a migração de neutrófilos para os pulmões e diminuir do estresse oxidativo, sugere-se que este possui atividade anti-inflamatória em modelo de LPA induzida por LPS em camundongos.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq, por ser o órgão financiador e apoiar a pesquisa e pelo orientador Prof. Dr. Roberto K. N. Cuman pela oportunidade de fazer parte do projeto.

Referências

BERNARD, G. R., ARTIGAS, A., BRIGHAM, K. L. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, n. 149, p. 818-824, 1994.

BONAMIN, F.; MORAES, T. M.; DOS SANTOS, R. C.; KUSHIMA, H.; FARIA, F. M.; SILVA, M. A.; JUNIOR, I. V.; NOGUEIRA, L.; BAUAB, T. M.; BRITO, T. A. M. S.; ROCHA, L. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of b-myrcene in preventing peptic ulcer disease. **Chemico - Biological Interactions**, v. 212, p. 11–19, 2014.

CIFTCI, O.; OZTANIR, M. N.; CETIN, A. Neuroprotective Effects of b-Myrcene Following Global Cerebral Ischemia/Reperfusion-Mediated Oxidative and Neuronal Damage in a C57BL/J6 Mouse. **Neurochemistry research**, 2014.

LORENZETTI, B. B.; SOUZA, G. E.; SARTI, S. J.; SANTOS FILHO, D.; FERREIRA, S. H. Myrcene mimics the perypheral analgesic activity of lemongrass tea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 43–48, 1991.