

## EFEITOS DO $\beta$ -CARIOFILENO SOBRE A LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM CAMUNDONGOS: ASPECTOS HISTOLÓGICOS

Rafaela Mariana Moraes de Carvalho (PIBIC-FA), Francielli Maria de Souza Silva Comar (Co-orientador), Jurandir Fernando Comar (Orientador).

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

**Área e sub-área do conhecimento:** Bioquímica – Metabolismo e Bioenergética

**Palavras-chave:**  $\beta$ -cariofileno, lesão pulmonar aguda, análise histológica

### Resumo:

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma síndrome de insuficiência respiratória caracterizada por infiltração pulmonar, edema e hipoxemia grave. A fisiopatologia da LPA 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- $\alpha$ . O  $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ -Cary) é um sesquiterpeno bi-cíclico, um dos compostos mais abundantes do óleo de copaíba (*Copaifera L.*), que apresenta diversas propriedades farmacológicas, incluindo propriedades anti-inflamatória. Sendo assim, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento com  $\beta$ -Cary sobre as alterações histológicas no tecido pulmonar, promovidas pela administração intranasal de LPS. Neste estudo. Verificou-se que o tratamento com  $\beta$ -Cary, na dose de 215 mg/Kg atenuou o processo inflamatório no pulmão, reduzindo a migração de células inflamatórias para o tecido pulmonar. Além disso, observou-se que os pulmões dos animais pré-tratados com  $\beta$ -Cary 215 mg/kg, apresentaram uma menor alteração na histo arquitetura pulmonar, tais como a ausência de edema e focos hemorrágicos. Os dados obtidos nesse estudo demonstram  $\beta$ -Cary possui efeito anti-inflamatório no referido modelo, por atenuar a migração celular e reduzir a magnitude do edema pulmonar.

### Introdução

A LPA induzida por LPS é um modelo de inflamação aguda pulmonar em camundongos que apresenta muitas semelhanças com a LPA humana: aumento da permeabilidade capilar, edema pulmonar e um acentuado influxo de células inflamatórias (Ingenito et al., 2001). A ativação da resposta inflamatória ao LPS ocorre via receptor Toll like 4 (TRL4) nas células hospedeiras, resultando na ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B), aumentando assim a expressão de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (Dolinay et al., 2012). Portanto, as citocinas pró-inflamatórias exercem papel chave

na LPA, pois são as responsáveis por iniciar, amplificar e perpetuar a patologia (Goodman et al., 2003). Elevados níveis de TNF- $\alpha$  estão associados à progressão da LPA por induzir a adesão de neutrófilos nas células endoteliais, um fenômeno que resulta em intensa migração e infiltração de neutrófilos nos espaços pulmonares (Thorley et al., 2007). O  $\beta$ -Cary é um sesquiterpeno bi-cíclico, um dos compostos mais abundantes do óleo de copaíba (*Copaifera L.*), que apresenta diversas propriedades farmacológicas já descritas na literatura, incluindo propriedades anti-inflamatória. Em estudo recente realizado por nosso grupo de pesquisa demonstramos que o tratamento com  $\beta$ -cariofileno, nas doses de 215 e 430 mg/Kg atenuou o processo inflamatório, induzido pela administração intranasal de LPS, por reduzir o número de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA) e a atividade da enzima mieloperoxidase no tecido pulmonar. Diante do exposto acima, este estudo objetiva investigar os efeitos do tratamento com  $\beta$ -cariofileno sobre as alterações histológicas no tecido pulmonar, promovidas pela administração intranasal de LPS

## Materiais e Métodos

Utilizou-se camundongos Balb-c, pesando de 20-25g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá - Paraná (UEM). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá – UEM e aprovado sob o CEUA nº 9908100120. Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos: controle, LPS, LPS +  $\beta$ -Cary (50, 100, 215 ou 430 mg/kg) ou LPS + dexametasona (DEX, 1 mg/kg).  $\beta$ -Cary e DEX foram administrados via oral. Os animais dos grupos controle e LPS receberam igual volume de solução fisiológica. Uma hora após o tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina e 50  $\mu$ L de solução de LPS (2,5 mg/Kg) administrado por via intranasal nos camundongos para induzir a LPA.

Para a análise histológica, 24 horas após a indução da LPA, os pulmões dos animais, tratados ou não, foram retirados, desmineralizados em solução de formaldeído a 10% durante três dias, e o formaldeído, então foi substituído por solução de EDTA em salina (3g/30mL). Após esse processo as amostras foram armazenadas em solução de 70% de etanol a 4°C. As amostras foram submetidas a um processo de desidratação utilizando soluções de etanol (70, 80, 90 e 100%), diafanizadas em xilol e embebidas em parafina. As amostras foram seccionadas a 4 $\mu$ m de espessura, utilizando um micrótomo rotativo (LeicaRM2245). Os cortes foram fixados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (HE), sendo fotomicrografados no microscópio de captura Olympus BX50 acoplado a uma câmera digital 3CCD. Os parâmetros histológicos estudados foram: a espessuras da parede do alvéolo, a diminuição do lúmen alveolar e a presença de células polimorfonucleares.

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

No grupo controle negativo não foram encontrados focos inflamatórios no tecido pulmonar e verificou-se ausência de granulócitos tais como neutrófilos, basófilos e eosinófilos. Por outro lado, no grupo controle positivo (induzidos por LPS), foi encontrado uma maciça presença de células inflamatórias, além de outras características da LPA, tais como dano alveolar difuso (DAD) e edema intra-alveolar. Para os grupos de tratamento, não houve diferenças significativas entre as doses (50, 100, 215 e 430 mg/kg) testadas. Entretanto, nota-se uma diminuição das características inflamatórias para o grupo tratado com  $\beta$ -Cary 215 mg/kg.

Após análise histopatológica pulmonar, verificou-se que os pulmões dos animais do grupo controle (1) apresentaram septo alveolar íntegro e alvéolos normais. Além claro, da ausência de hemorragia, congestão e focos inflamatórios no interior dos alvéolos. Para o grupo controle positivo, observou-se elevada alteração na arquitetura histológica do pulmão, com diminuição do lúmen alveolar, espessamento da parede do alvéolo e presença de áreas edematosas (2). O grupo tratado com  $\beta$ -Cary 50 mg/kg apresentou alteração na espessura da parede alveolar, entretanto em menor grau comparado ao grupo controle positivo (3). Os pulmões dos animais pré-tratados com  $\beta$ -Cary 215 mg/kg (5), apresentaram uma menor alteração na histo arquitetura pulmonar, comparada aos outros grupos (4 e 6), tais como a ausência de edema e focos hemorrágicos.

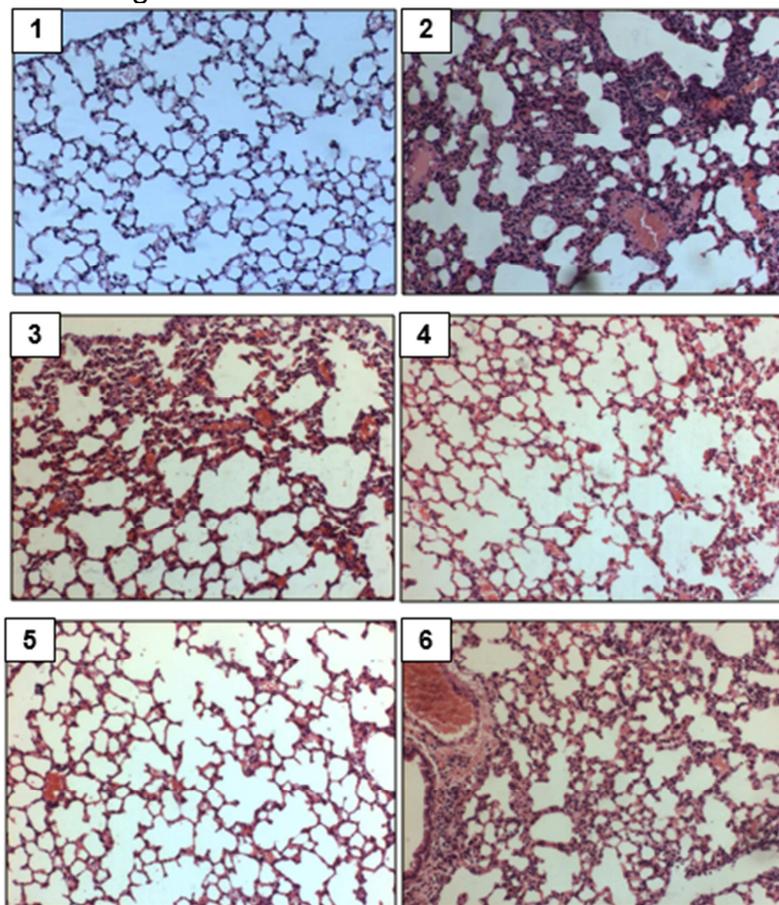


Figura 1 – Lâminas coradas com Hematoxilina & Eosina, capturadas no aumento de 10x.

## Conclusões

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

## Agradecimentos

Agradecimentos a Fundação Araucária pela bolsa de fomento científico.

## Referências

DOLINAY, T.; KIM, Y. S.; HOWRYLAK, J.; HUNNINGHAKE, G. M.; AN, G. H.; FREDENBURGH, L.; MASSARO, A. F.; ROGERS, A.; GAZOURIAN, L.; NAKAHIRA, K.; HASPEL, J. A.; LANDAZURY, R.; EPPANAPALLY, S.; CHRISTIE, J. D.; MEYER, N.J.; WARE, L. B.; CHRISTIANI, D. C.; RYTER, S. W.; BARON, R. M.; CHOI, A. M. K. Inflammation-regulated Cytokines Are Critical Mediators of Acute Lung Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 185, pp. 1225 – 1234, 2012.

GOODMAN, R. B.; PUGIN, J.; LEE, J. S.; MATTHAY, M. A. Cytokine mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol.14, pp. 523–535, 2003.

INGENITO, E. P.; MORA, R.; CULLIVAM, M.; Decreased surfactant protein B expression and surfactant dysfunction in a murine model of acute lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 25, pp.35-44, 2001.

THORLEY, A. J.; FORD, P. A.; GIEMBYEZ, M. A.; GOLDSTRAW, P.; YOUNG, A.; TETLEY, T. D. Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages. *J Immunol*, vol. 178, pp. 463–473, 2007.