

EFEITO DO β -MIRCENO SOBRE A INFECÇÃO POLIMICROBIANA EM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE MURINA

Ulisses Gonçalves Serra Guarrata (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Gabriela Janeiro, Edvalkia Magna Teobaldo da Rocha, Francielli Maria Souza Silva-Comar (Co-orientadora), Roberto Kenji Nakamura Cuman (Orientador) rkncuman@uem.br.

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

Área: Farmacologia

Subárea do conhecimento: Farmacologia

Palavras-chave: Terpenos, resposta inflamatória, sepse

RESUMO

O β -Mirceno é um monoterpeno que apresenta uma variedade de atividades biológicas, dentre elas a anti-inflamatória. A sepse está bem estabelecida como um processo inflamatório sistêmico e de difícil tratamento. Nesta pesquisa foi utilizado o modelo experimental de sepse em murinos pela infecção polimicrobiana sistêmica induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP). Os resultados mostraram que o β -Mirceno não apresentou citotoxicidade para as células e, em doses de 100 e 200 mg/kg, reduziu o recrutamento de leucócitos para a área da infecção e a carga bacteriana no sangue. Os resultados indicam uma provável atividade anti-inflamatória sistêmica e antimicrobiana neste modelo experimental.

INTRODUÇÃO

O β -Mirceno é um monoterpeno que apresenta atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, e está presente em plantas do gênero *Verbena* e no lúpulo. Suas atividades indicam uma possível atividade anti-inflamatória sistêmica, como no caso da sepse, que corresponde a uma resposta inflamatória alterada, podendo levar a uma disfunção orgânica potencialmente fatal (Singer et al., 2016). Para realizar o estudo da sepse, o modelo experimental de sepse por CLP é amplamente utilizado, pois induz peritonite com intensa infiltração de neutrófilos e macrófagos no peritônio e bacteremia, simulando algumas condições clínicas tais como as observadas na apendicite e diverticulite (Rittirsch et al., 2009). Assim, nesta pesquisa foram estudados os efeitos do β -Mirceno, em um modelo experimental de sepse murina, avaliando a citotoxicidade *in vitro* (MTT), o recrutamento leucocitário peritoneal e a bacteremia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

A pesquisa foi realizada utilizando camundongos machos C57BL/6, pesando de 20 a 25g, mantidos em ambiente de temperatura apropriada (22 ± 2°C), em ciclo claro/escuro de 12 horas, com alimentação à livre demanda de ração (Nuvilab®, Colombo, PR, Brasil) e água. Os procedimentos foram experimentais aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá (Parecer nº4628291021).

O tratamento dos animais foi realizado por via oral (gavagem) com β-Mirceno ou veículo (água), em dose única, uma hora antes da indução da cirurgia para a realização da CLP. Os animais submetidos à CLP, grupo controle (CLP), com exposição do material fecal. Grupo de animais falso-operados, grupo (SHAM), em que a cirurgia foi feita sem exposição do material fecal, tratados apenas com veículo e mais três grupos experimentais de animais submetidos à CLP e tratados com β-Mirceno em diferentes doses (50, 100 ou 200 mg/kg).

Procedimento cirúrgico e indução da infecção cirúrgica

Os animais foram anestesiados via intramuscular com Xilazina/Ketamina e foi realizada tricotomia abdominal e desinfecção da região abdominal com álcool iodado. Foi realizada uma incisão longitudinal de aproximadamente 1 centímetro para acesso à cavidade peritoneal e exposição da região ileocecal. Com fio de algodão, embebido em salina, foi realizada a ligação da região da válvula ileocecal e uma perfuração única no ceco, com uma agulha de calibre 0,8 milímetros. O ceco foi levemente pressionado para exteriorização de pequena quantidade de material fecal. Após esse procedimento, o intestino foi recolocado na cavidade peritoneal e o peritônio e a pele, suturados. Posteriormente foi administrado 1mL de salina por via subcutânea na região dorsal dos animais.

Citotoxicidade in vitro (Ensaio MTT)

O ensaio de MTT foi conduzido com modificações. O ensaio MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) é baseado na redução da enzima mitocondrial do corante tetrazólio para detectar e determinar a citotoxicidade. Os leucócitos foram plaqueados a 5 x 10⁵ células/poço em 100 µl de meio RPMI (com 10% de soro fetal bovino + 100 U/mL de penicilina + 100 µg/mL de estreptomicina). Após 90 minutos de exposição aos compostos analisados β-Mirceno (3, 10, 30 ou 90 µg/mL) e veículo, 10 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço e então incubados a 37°C e com 5% de CO₂ por 2 horas. Posteriormente, 150µL de sobrenadante foram removidos e 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados a cada poço e as células foram novamente incubadas a 25°C com 5% de CO₂ durante 10 min. A absorbância foi determinada a 550 nm. A viabilidade foi obtida pela fórmula:

$$\text{Viabilidade Celular} = \frac{\text{absorbância de células tratadas} - \text{absorbância do branco}}{\text{absorbância do controle} - \text{absorbância do branco}}$$

Contagem Leucocitária Total e diferencial na cavidade abdominal

Após 6 horas da indução de sepse, a cavidade peritoneal foi lavada com PBS/EDTA, e o lavado coletado em seringa estéril para contagem de leucócitos

totais em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial, lâminas foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa.

Contagem de bactérias no sangue

Após eutanásia utilizando dose alta de anestésico (xilazina/ketamina), foi feita punção do plexo ocular e o sangue coletado em recipientes estéreis com quantificação de bactérias viáveis no sangue sendo realizada por semeadura em Mueller-Hinton e contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) por ml de amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nossos experimentos para avaliação da citotoxicidade utilizando-se o ensaio de MTT, o β -Mirceno não apresentou toxicidade *in vitro* em nenhuma das concentrações testadas (3, 10, 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$), apresentaram viabilidade celular superior a 90%, o que vai de acordo com resultados mostrados por outros estudos (Cavalcante et al., 2020).

Seis horas após a indução da sepse, foi observado um aumento significativo no número de leucócitos recrutados na cavidade peritoneal ($P < 0,05$) no grupo de animais sépticos (CLP: $10,371 \pm 2,599$ células/ mm^3 , $*P < 0,05$) em comparação ao grupo SHAM ($1,881 \pm 285$ células/ mm^3). O tratamento com β -Mirceno nas doses de 100 e 200 mg/kg promoveu uma redução no número total de leucócitos (46% e 45%) em comparação ao grupo CLP ($5,619 \pm 1,204$ e $5,665 \pm 811$), respectivamente, $\#P < 0,05$), enquanto que na dose de 50 mg/kg ($9,910 \pm 1276$, $\#P < 0,05$) não reduziu o número de células migradas.

A redução da contagem de leucócitos para a cavidade peritoneal promovida pelo β -Mirceno nas doses de 100 e 200 mg/kg é devido tanto à redução de leucócitos PMN quanto de mononucleares, como evidenciado em nossos resultados. Em estudo semelhante, Rocha e colaboradores (ROCHA et al., 2011) demonstraram a diminuição do recrutamento de leucócitos em modelo de peritonite induzida, e o mecanismo proposto foi seu efeito sobre a inibição de mediadores inflamatórios, tais como: prostaglandinas, TNF e outros. Vários trabalhos mostraram que produtos naturais e óleos essenciais contendo sesquiterpenos reduzem a migração de leucócitos em modelos experimentais de inflamação (Kummer et al., 2015, Silva-Comar et al., 2014). Similarmente, o β -Mirceno pode envolver também a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores, como já reportado. Avaliamos o efeito do β -Mirceno sobre a quantidade de bactérias no sangue dos animais submetidos à CLP. Foi observado que o número de UFC no sangue dos animais após indução de infecção por CLP aumentou em comparação com o grupo SHAM. O tratamento dos compostos nas doses testadas de 50, 100 e 200 mg/kg reduziu significativamente o número de bactérias viáveis no sangue dos animais, sugerindo um efeito antimicrobiano deste composto na bacteremia em animais sépticos.

CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que o β -mirceno apresenta reduzida citotoxicidade *in vitro*, apresentando importante atividade sobre a migração leucocitária e redução da infecção sistêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq, Fundação Araucária/PR, CAPES, laboratório de inflamação, ao meu orientador, aos alunos de pós-graduação e aos técnicos.

REFERÊNCIAS

CAVALCANTE, H.A.O. et al. Effect of (-)- α -Bisabolol on the Inflammatory Response in Systemic Infection Experimental Model in C57BL/6 Mice. **Inflammation**, 42: 1-11, 2019.

KUMMER, R. ; SILVA, C. F. E. ; BASTOS, R.L. ; ROCHA, B.A. ; SPIRONELLO, R.A. ; NUNES-YAMADA, A ; AMADO, C. A. B. ; CUMAN, R.K.N. . Alpha-pinene reduces in vitro and in vivo leukocyte migration during acute inflammation. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, 8: 12-17, 2015.

RITTIRSCH, Derek; HUBER-LANG, Markus S.; FLIERL, Martin A.; WARD, Peter A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 31–36, jan. 2009.

ROCHA, B.A.; RITTER, A.M.V.; AMES, F.Q.; GONÇALVES, O.H.; LEIMANN, F.V.; BRACHT, L.; NATALI, M.R.M.; CUMAN, R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A.B. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: Preventive effect of trans anethole. **Biomed Pharmacother**, 86: 213-220, 2017.

SILVA-COMAR, F.M.S.; WIIRZLER, L.A.M.; SILVA-FILHO, S.E.; KUMMER, R.; PEDROSO, R.B.; SPIRONELLO, R.A.; SILVA, E.L.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Effect of Estragole on Leukocyte Behavior and Phagocytic Activity of Macrophages. **Evid-Based Complem Altern Med**, 2014: 1-7, 2014.

SINGER, M. et al. **The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)**. JAMA, v. 315, n. 8, p. 801–810, 2016.