

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

GABRIELLA SAORY KONDO

**Efeitos do β -cariofileno isolado do óleo de cravo sobre a lesão pulmonar aguda
induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos**

**Maringá
2021**

GABRIELLA SAORY KONDO

Efeitos do β -cariofileno isolado do óleo de cravo sobre a lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Jurandir Fernando Comar

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Francielli M. S. Silva

**Maringá
2021**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação
(CIP)(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR,
Brasil)

S239e

Kondo, Gabriella Saory

Efeitos do *B*-cariofileno isolado do óleo de cravo sobre a lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos / Gabriella Saory Kondo. -- Maringá, PR, 2021.

35 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Jurandir Fernando Comar.
Coorientadora: Profa. Dra. Francielli Maria Souza Silva Comar.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2021.

CDD 23.ed. 572.4

GABRIELLA SAORY KONDO

Efeitos do β -cariofileno isolado do óleo de cravo sobre a lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos

Dissertação/tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências Biológicas, sob apreciação da seguinte banca examinadora:

Aprovado em: 30 / 08 / 2021

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Jurandir Fernando Comar
(presidente)

Prof. Dr. Saulo Euclides Silva-Filho
(FACFAN-UFMS)

Prof. Dr. Nancy Sayuri Uchida
(DENUT/UNICENTRO)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me acompanhado todos os meus passos durante este trabalho, mesmo com uma pandemia e muitos outros obstáculos que apareceram.

À minha família, minha mãe Claudia, meu pai Ricardo e meu irmão Rafael por todo apoio e amor que me proporcionou até hoje.

Ao meu namorado Douglas, que me aguentou e me deu amor nos dias mais difíceis.

Aos meus amigos, que estiveram comigo em todos os momentos desde a graduação.

Aos companheiros do laboratório, Louise, Guilherme, Isabela, Gabriel, Magna, Celia e o querido Jailson por ajudarem em tudo, se frustrarem comigo quando dava errado e comemorarem comigo quando os experimentos davam certo

À minha coorientadora, Professora Francielli e ao meu orientador, Professor Jurandir que me guiou durante a pesquisa, me ajudou nos momentos cruciais e de ter compartilhado seu vasto conhecimento.

À todos professores, técnicos e pós graduandos do departamento de Bioquímica, pela atenção e suporte fornecido.

Aos CNPq e a todos os órgãos de fomento à pesquisa, que ainda lutam pela sobrevivência da pesquisa no Brasil, pelo apoio financeiro.

Este é um trabalho realizado no Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da UEM. A presente dissertação está apresentada em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UEM.

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS: A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma síndrome de insuficiência respiratória caracterizada por infiltração pulmonar difusa, edema e hipoxemia grave. Os fatores de risco para a LPA incluem pneumonia, trauma, sepse, choque, e, mais recentemente, COVID-19. Cerca de 30% dos pacientes com COVID-19 desenvolvem LPA. A fisiopatologia da LPA envolve uma intensa resposta inflamatória pulmonar associada com edema, ativação de macrófagos e recrutamento de neutrófilos. Os neutrófilos e macrófagos ativados secretam espécies reativas de oxigênio e proteases que lesam o epitélio alveolar. A LPA induzida por lipopolissacarídeo (LPS) é um modelo de inflamação pulmonar em camundongos que apresenta muitas semelhanças com a LPA humana. O β -cariofileno (β -Cary) é um sesquiterpeno encontrado em óleos essenciais e tem sido relatado que apresenta atividade anti-inflamatória. Este composto é o segundo mais abundante (6 – 17%) do óleo essencial extraído dos botões de cravo, depois do eugenol que corresponde a 70-90%. Até o momento nenhum estudo foi realizado para verificar se o β -Cary melhora a inflamação da LPA. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do β -Cary isolado do óleo de cravo na LPA induzida por LPS em camundongos, quando administrado oralmente.

MÉTODOS: O β -Cary do óleo de cravo foi adquirido da Quinarí Fragrâncias e Cosméticos Ltda (Ponta Grossa, PR, Brasil) e caracterizado quimicamente por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS), revelando pureza de 91%. A quimiotaxia *in vitro* foi realizada em câmara de Boyden usando neutrófilos da cavidade peritoneal de camundongos com peritonite induzida por zimosan. As células foram incubadas com β -Cary nas concentrações de 3, 10, 30 e 90 μ g/mL por 30 min e fMLP foi o agente quimioatraente. A viabilidade celular, pelo método de MTT, e o ensaio de fagocitose foram realizados com β -Cary nas mesmas concentrações. Para os experimentos *in vivo*, camundongos BALB-c foram tratados oralmente com veículo ou β -Cary em doses de 50, 100, 200 e 400 mg/kg. Após 1 h, os animais foram anestesiados e receberam 5 mg/kg de LPS ou solução salina (controle) por via intranasal para induzir LPA. Após 24 h, os animais foram eutanaziados e lavado brônquico-alveolar (LBA) e tecido pulmonar foram coletados. Células totais e polimorfonucleares (PMN) foram contadas e a concentração de óxido nítrico foi verificada no LBA. As razões peso úmido/ seco (W/D) do pulmão foram utilizadas para determinar o edema pulmonar. A

atividade da mieloperoxidase (MPO) e a liberação de citocinas pró-inflamatórias foram medidas no tecido pulmonar. O protocolo animal foi aprovado pelo CEUA da UEM. ANOVA ONE-WAY (e teste post hoc de NeumanKeuls) e teste t de Student ($p < 0,05$) foram usados para analisar a significância estatística dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: O ensaio de quimiotaxia *in vitro* mostrou que o fMLP induziu uma migração leucocitária significativa quando comparado com o grupo controle (RPMI 1640). Após a incubação dos neutrófilos com β -Cary (3, 10, 30 e 60 $\mu\text{g} / \text{mL}$), foi observada uma redução significativa da migração de neutrófilos em resposta à estimulação de fMLP. Nossos resultados demonstraram que o β -Cary diminuiu significativamente a capacidade fagocitária dos neutrófilos em todas as concentrações testadas, quando comparado ao grupo LPS. Os camundongos do grupo LPS apresentaram um aumento significativo do número de neutrófilos no LBA, o qual foi relacionado à migração de PMN. O tratamento com 100, 200 e 400 mg/kg de β -Cary reduziu a migração de neutrófilos em 35%, assim como o número de PMN. O acúmulo de neutrófilos no pulmão foi avaliado pela atividade de MPO, que aumentou após a administração de LPS. O tratamento com 100, 200 e 400 mg/kg de β -Cary reduziu a atividade de MPO em 43%. Os efeitos do β -Cary na razão W/D do pulmão induzida por LPS foram medidos para avaliar o edema pulmonar neste estudo. Os resultados demonstraram que o desafio com LPS aumentou significativamente a razão W/D do pulmão. Em comparação com o grupo LPS, β -Cary (200 mg/kg) inibiu notavelmente a razão W/D pulmonar induzida por LPS. A produção de NO foi monitorada medindo-se o nível de nitrito no LBA por meio da reação de Griess. A administração intranasal de LPS aumentou significativamente os níveis de NO no LBA, que foram significativamente atenuados após o tratamento com β -Cary (em todas as doses testadas). As citocinas iniciam, amplificam em cascata e perpetuam a resposta inflamatória na LPA. Nossos resultados mostraram que o aumento da citocina inflamatória induzida por LPS, IL-1 β , também foi inibida por β -Cary (200 mg / kg). Em relação à citocina anti-inflamatória IL-10, o LPS reduziu os níveis da citocina IL-10 no pulmão e o β -Cary (200 mg / kg) foi capaz de aumentar os níveis dessa citocina.

CONCLUSÃO: No geral, este estudo sugere que β -Cary melhora a LPA em camundongos por meio da atenuação da migração de neutrófilos para os pulmões, e esse

efeito parece estar relacionado à capacidade do β -Cary em reduzir os níveis de citocinas inflamatórias, tais como a IL-1 β .

PALAVRAS-CHAVE: inflamação pulmonar, lipopolissacarídeo, β -cariofileno, citocinas

GENERAL ABSTRACT

BACKGROUND: Acute lung injury (ALI) is a respiratory failure syndrome characterized by diffuse pulmonary infiltration, edema and severe hypoxemia. Risk factors for ALI include pneumonia, trauma, sepsis, and, more recently, COVID-19 [1], with nearly 30% of patients with COVID-19 developing ALI. The pathophysiology of ALI involves an intense pulmonary inflammatory response associated with edema, macrophages activation and neutrophils recruitment. Neutrophils and activated macrophages secrete reactive species and proteases, which damage the alveolar epithelium. The lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury (ALI) is a model of lung inflammation in mice that shares many features of human ALI. (-)- β -caryophyllene (β Cary) is a sesquiterpene found in essential oils and has been reported to present anti-inflammatory activity. This compound is the second most abundant (6-17%) of the essential oil extracted from clove buds, after eugenol that comprises 70-90%. To date, no study has been carried out to verify whether β -Cary improves the inflammation in ALI. Thus, this work aimed at evaluating the effects of β -Cary isolated from clove oil on LPS-induced ALI in mice, when orally administered.

METHODS: β -Cary from clove bud oil was purchased from QuinaríFragrâncias e CosméticosLtda (Ponta Grossa, PR, Brazil) and chemical characterized by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS), revealing a purity of 91%. Chemotaxis *in vitro* was carried out in Boyden chambers using leukocytes from the peritoneal cavity of mice with zymosan-induced peritonitis. The cells were incubated with β -Cary at the concentrations of 3, 10, 30 and 90 μ g/mL for 30 min and fMLP was the chemoattractant. Cell viability, by MTT methods, and phagocytosis assay was performed with β -Cary at the same concentrations. For *in vivo* experiments, BALB-c mice were orally treated with vehicle or β -Cary at doses of 50, 100, 200 e 400 mg/kg. After 1 h, anesthetized animals received 5 mg/kg LPS or saline (control) intranasally to induce ALI. After 24 h, the animals were euthanized and bronchial alveolar lavage (BAL) and lung tissue was collected. Total and polymorphonuclear cells (PMN) were counted and nitric oxide concentration was verified in the BAL.Lung wet/dry (W/D) ratios was utilized to lung edema determined. Myeloperoxidase (MPO) activity and

release of pro-inflammatory cytokines were measured in the lung tissue. The animal protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of UEM. ANOVA ONE-WAY (and Neuman Keuls post hoc test) and student t test ($p < 0.05$) were used to analyze the statistical significance of data.

RESULTS AND DISCUSSION: *In vitro* chemotaxis assay showed that fMLP induced a significant leukocyte migration when compared with the control group (RPMI 1640). After leukocytes incubation with β -Cary (3, 10, 30, and 60 $\mu\text{g/mL}$) a significant reduction of leukocyte migration in response to fMLP stimulation was observed. Our results demonstrated that β -Cary decreased significantly the neutrophils phagocytic ability at all tested concentrations, when compared with LPS group. Mice of the LPS group showed a significant increase of the number of leukocytes in the BAL, which was related to the migration of PMN. Treatment with 100, 200 and 400 mg/kg β -Cary reduced the leukocytes migration by 35% as well as the number of PMN. The accumulation of neutrophils in the lung was assessed by the MPO activity, which increased after LPS administration. Treatment with 100, 200 and 400 mg/kg β -Cary reduced MPO activity by 43%. The effects of β -Cary on LPS-induced lung W/D ratio were measured to assess lung edema in this study. The results demonstrated that LPS challenge significantly increased the lung W/D ratio. Compared to the LPS group, β -Cary (200 mg/kg) remarkably inhibited LPS-induced lung W/D ratio. The NO production was monitored by measuring the nitrite level in the BAL through the Griess reaction. Intranasal administration of LPS significantly increased NO levels in BAL, that were significantly attenuated after β -Cary treatment (at all doses tested). Cytokines initiate, amplify, and perpetuate the cascade inflammatory response in ALI. Our results showed that the increased LPS-induced inflammatory cytokine IL-1 β , were also inhibited by β -Cary (200 mg/kg). Regarding the IL-10 anti-inflammatory cytokine, LPS reduced IL-10 cytokine levels in the lung and β -Cary (200 mg/kg) was able to increase this cytokine levels.

CONCLUSION: Overall, this study suggests that β Cary improves ALI in mice by means of attenuating the neutrophils migration to the lungs, and this effect appears to be related to β -Cary ability in reduce inflammatory cytokine levels, such as IL-1 β .

KEYWORDS: lung inflammation, lipopolysaccharide, β -caryophyllene, cytokines

INTRODUÇÃO

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma síndrome de insuficiência respiratória caracterizada por: infiltração pulmonar bilateral e difusa, edema pulmonar e hipoxemia grave [Bernard et al., 1994]. Os fatores de risco para a LPA incluem pneumonia, aspiração gástrica, trauma torácico, sepse, choque, lesão por inalação, e, mais recentemente, a infecção pelo SARS-CoV-2, causador da COVID-19 [Li et al., 2020; Gallelli et al., 2020; Chen et al., 2020; Villas-Boas et al., 2020; Ware, 2006; Tsushima et al., 2009]. Sem considerar os casos associados com a COVID-19, a LPA apresenta incidência mundial de aproximadamente 80 casos por 100 mil habitantes ao ano e taxa de mortalidade variando entre 30 e 50% [Rubinfeld et al., 2005; Jiang et al., 2017]. Esta incidência é ainda maior na faixa etária acima de 75 anos, apresentando mais de 300 casos por 100 mil habitantes ao ano [Zambon & Vincent, 2008]. Entretanto, com o surgimento da COVID-19, a real incidência da LPA certamente passa a ser muito maior, já que aproximadamente 30% dos pacientes com COVID-19 desenvolvem LPA [Li et al., 2020].

A fisiopatologia da LPA envolve uma intensa resposta inflamatória pulmonar caracterizada por recrutamento de neutrófilos, edema e lesão do parênquima pulmonar [Ware, 2000]. Na fase inicial ou exsudativa, os pacientes apresentam um déficit de oxigenação causado por redução da elasticidade pulmonar. Na sequência, ocorre uma forte resposta inflamatória com ativação de macrófagos residentes, que secretam citocinas, principalmente IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α . Estas citocinas estimulam a quimiotaxia e ativação de neutrófilos, os quais aderem ao endotélio e migram através do interstício para atingir o espaço alveolar [Ware, 2006; Grommes & Soehnlein, 2011]. Em adição, neutrófilos ativados produzem e secretam citocinas e outros mediadores que lesam diretamente o epitélio alveolar, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases [Capelozzi, 2011]. A lesão do epitélio alveolar promove um aumento da

permeabilidade capilar, o que determina o edema intersticial e alveolar [Garcia & Pelosi, 2011]. Altos níveis de citocinase ROS no LBA nos estágios iniciais da LPA estão associados a um aumentado risco de mortalidade [Shelton et al., 2007; Parsons et al., 2005].

A LPA induzida por lipopolissacarídeo (LPS) é um modelo de inflamação pulmonar em camundongos que apresenta muitas semelhanças com a LPA humana: aumento da permeabilidade capilar, edema pulmonar e um acentuado influxo de células inflamatórias [Zhang et al., 2010, Matthay et al., 2012]. Para a indução da LPA em camundongos, o LPS é administrado por via intranasal ou intratraqueal, atingindo os pulmões e promovendo efeitos inflamatórios que são acompanhados por aumento de citocinas, principalmente TNF- α , e a ativação direta de macrófagos [Kielian & Blecha, 1995]. A ligação do LPS com o receptor *Toll like 4* inicia uma resposta inflamatória por ativar a cascata de sinalização que culmina na ativação do fator de transcrição NF- κ B. Este último aumenta a expressão de citocinas e enzimas pró-inflamatórias, principalmente TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) [Dambrova et al., 2010; Dolinay et al., 2012; Matute-Bello et al., 2008]. As citocinas exercem papel chave na LPA, pois são as responsáveis por iniciar, amplificar e perpetuar a patologia. Altos níveis de TNF α estão associados à progressão da LPA por induzir a adesão de neutrófilos nas células endoteliais, o que resulta em intensa migração e infiltração destas células nos espaços pulmonares [Thorley et al., 2007]. Em adição, TNF α ativa a síntese de leucotrienos (LTB₄) e prostaglandina E₂ (PGE₂), mediadores responsáveis por broncoconstrição [Tasaka et al., 2002].

O β -cariofileno ou (-)-trans-cariofileno é um sesquiterpeno encontrado em grandes quantidades nos óleos essenciais derivados de muitas plantas e especiarias, tais como o cravo (*Syzygium aromaticum*) [Maffei, 2020]. O β -cariofileno pode ser obtido por síntese assimétrica, que produz um (-)-enantiômero altamente puro, mas com elevado custo. Por outro lado, o (-)- β -cariofileno é o único enantiômero isolado de plantas superiores e pode ser obtido de óleos essenciais em uma forma relativamente pura [del Castillo et al., 2004]. O β -cariofileno constitui de 6 a 17% do óleo essencial extraído dos botões de cravo, atrás apenas do eugenol, que constitui de 70 a 90% desse óleo [Nurdjannah & Bermawie, 2012]. Após a extração do eugenol, a fração remanescente é chamada β -cariofileno natural, embora outros compostos possam ser encontrados em pequenas quantidades [Widayat et al., 2015; Nurdjannah & Bermawie,

2012]. Foi já relatado que o β -cariofileno natural extraído do óleo de botões cravo diminui a inflamação e a carga bacteriana da mucosa gástrica de camundongos infectados com *Helicobacter pylori* [Jung et al., 2020]. Muitas propriedades terapêuticas têm sido atribuídas ao β -cariofileno, como atividades anti-inflamatória, neuroprotetora, antidepressiva, antialérgica, antioxidante e antitumoral [Ames-Sibin et al., 2018; Liu et al., 2015; Calleja et al., 2013; Bento et al., 2011; Gretsche et al., 2008]. A atividade anti-inflamatória, no entanto, tem sido a propriedade mais investigada do β -cariofileno, o qual tem sido mostrado inibir em ratos o edema de patas induzido por LPS e carragenina [Medeiros et al., 2007; Fernandes et al., 2007], inibir em camundongos a pleurisia induzida por *Mycobacterium bovis* (BCG) [Andrade-Silva et al., 2016], atenuar a inflamação intestinal em camundongos com colite induzida por sulfato de dextrana [Bento et al., 2011], e diminuir a inflamação sistêmica em ratos com artrite induzida por adjuvante [Ames-Sibin et al., 2018]. No entanto, até o momento, nenhum estudo foi realizado para verificar se o β -cariofileno melhora a inflamação na LPA. Por esta razão, o presente estudo investigou os efeitos do β -cariofileno administrado por via oral na LPA induzida por LPS em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Compostos químicos

β -cariofileno, obtido do óleo de cravo, foi adquirido da Quinarí Fragrâncias e Cosméticos Ltda (Ponta Grossa, PR, Brazil). Lipopolissacarídeo (LPS), Carragenina, Zymosan, fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina), MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), o-ftalaldeído (OPT), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), glutathiona reduzida (GSH), cremophor e linoleato de etila foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros produtos químicos eram de qualidade analítica.

Caracterização química β -cariofileno natural

A caracterização química completa do β -cariofileno foi realizada no Mountain Research Centre (CIMO), em Portugal. Os compostos foram quantificados por

cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) conforme previamente descrito [Nikolić et al., 2014]. Em resumo, para a análise quantitativa, as amostras de β -cariofileno foram diluídas em etanol e injetadas em modo “split” (1:30) em um aparelho GC Clarus® 580, equipado com o injetor split-splitless conectado a coluna HP-5 (30 m \times 0,32 mm, espessura de filme 0,25 μ m) e ajustado a um detector de ionização de chama (FID). O gás transportador foi H₂ (1 mL/min/210°C); a temperatura do injetor será 250°C e do detector 280°C, enquanto a temperatura da coluna será programada linearmente 40-260°C a 4°C/min. A concentração percentual foi calculada a partir da área de cada pico.

A GC-MS foi então realizada em um sistema analítico Perkin Elmer com um módulo GC Clarus® 580 e um MS Clarus® SQ 8S GCD equipado com coluna HP-5MS (30 m \times 0,25 mm, espessura de filme 0,25 μ m). O gás transportador foi He (1 mL/min). As demais condições cromatográficas foram as mesmas que as do GC-FID. A linha de transferência foi aquecida a 260°C. Os espectros de massa foram registados no modo EI (70 eV), em um intervalo de m/z 40-450. A identificação dos constituintes individuais foi feita por comparação dos espectros com aqueles de bibliotecas de MS disponíveis (NIST/Wiley) e por comparação de seus índices de retenção determinados experimentalmente, com dados da literatura [Adams, 2009]. A validação do método foi feita de acordo com o guia ICH (International Conference of Harmonization guidelines), 2005, (<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology>).

Ensaio *in vitro*

Animais

Foram utilizados camundongos BALB-c pesando entre 20 e 25g. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada de 22°C num ciclo de claro/escuro de 12 horas com água e comida à vontade. Todos os protocolos utilizados no presente trabalho foram aprovados pelo CEUA da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM nº 3919220419).

Isolamento de células

A peritonite foi induzida em camundongos BALB-c com uma injeção intraperitoneal de zymosan na concentração de 1 mg por animal. Após 4 horas da injeção de zymosan, os

animais foram eutanasiados com overdose de cetamina/xilazina e a cavidade peritoneal foi lavada com tampão fosfato-salina (PBS, pH 7,4). Em seguida, o exsudato peritoneal foi centrifugado e o número de neutrófilos foi ajustado para 1×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 contendo 0,1% de albumina (BSA).

Ensaio de quimiotaxia in vitro

Os efeitos do β -cariofileno sobre o processo de quimiotaxia foram observados em Câmaras de Boyden (Boyden, 1962). Os neutrófilos foram isolados como descrito acima e as células foram, então, incubadas com β -cariofileno nas concentrações de 3, 10, 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$ por 30 minutos a 37°C em 5% de CO_2 . O controle negativo e positivo, que são células sem tratamento, foram incubados sem o β -cariofileno. Após a incubação, foram adicionados ao compartimento inferior da câmara de Boyden o quimioatratante fMLP (10^{-6} M) e o controle negativo (meio RPMI 1640). Uma membrana de policarbonato isenta de polivinilpirrolidona (Nuclepore; Neuroprobe), com poros de $5\mu\text{m}$ de diâmetro, foi utilizada para separar os compartimentos superior e inferior da câmara e a solução de neutrófilos para os controles e as suspensões de neutrófilos pré-tratadas com β -cariofileno foram pipetadas no compartimento superior. A câmara foi então incubada novamente nas condições descritas anteriormente por 90 minutos. Em seguida, a membrana foi lavada e corada utilizando InstantPro (Newprove®). Os neutrófilos que migraram pela membrana foram contados utilizando microscopia óptica (1000x). Foram contados cinco campos selecionados aleatoriamente e os resultados foram expressos como a média do número de leucócitos.

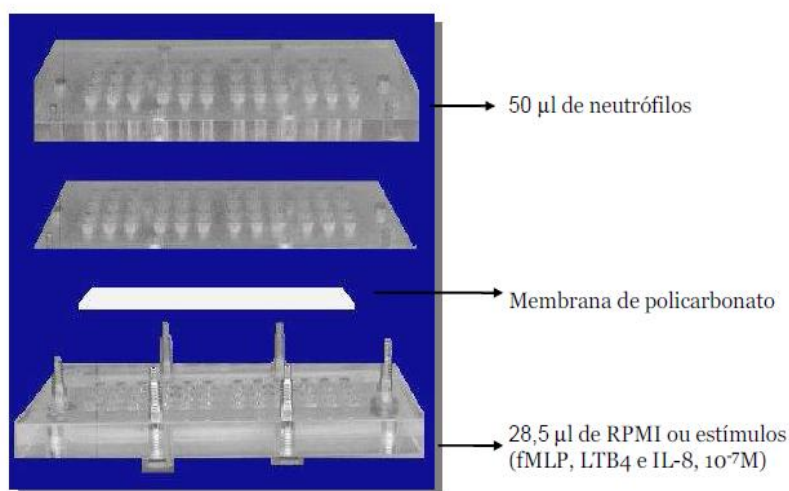


Figura 1. Modelo da Câmara de Boyden

Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pela redução do tetrazólio conforme descrito por Denizot e Lang (1986). Os neutrófilos foram isolados como descrito acima e incubados com sem nenhum tratamento como controle negativo e com β -cariofileno nas concentrações de 3, 10, 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$ por 90 minutos a 37°C em CO_2 5%. Após a incubação foi adicionado o MTT em cada poço e a placa foi incubada novamente por 120 minutos a 37°C com CO_2 5%. O sobrenadante foi então removido e foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço da placa, que foi novamente incubada por 10 minutos nas mesmas condições anteriores. A absorbância foi determinada em 550 nm e os valores expressos como porcentagem de viabilidade em relação ao controle negativo (100%).

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{absorbância da célula tratada} - \text{absorbância do branco}}{\text{absorbância do controle} - \text{absorbância do branco}}$$

Ensaio de fagocitose in vitro

Para avaliar os efeitos do β -cariofileno na fagocitose, neutrófilos foram isolados como descrito acima, e a suspensão de células foram tratadas com as concentrações 1, 3, 10, 30 e 90 $\mu\text{g/ml}$ de β -cariofileno e para o controle negativo e positivo não foi adicionado nenhum tratamento, e foi incubada por 30 minutos. Para indução da fagocitose, foram utilizadas partículas de zymosan previamente opsonizadas através da incubação com plasma de camundongo a 10%. As células tratadas foram então incubadas com a solução de zymosan previamente opsonizado por 30 minutos, a 37°C em 5% CO_2 , menos o controle negativo. Em seguida, foram preparadas lâminas com essa suspensão final de células, que foram fixadas e coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A contagem foi realizada em microscópio óptico e os resultados foram expressos em números de neutrófilos em fagocitose por 100 neutrófilos.

Animais e delineamento experimental

Camundongos machos da linhagem BALB-c, foram alimentados *ad libitum* com ração balanceada (Nuvilab[®], Colombo, Brasil) e mantidos em ciclo claro escuro de doze horas sob temperatura controlada de 22°C . Foram utilizados para os experimentos animais com 50 dias de idade com peso entre 20 e 25 gramas. Para os experimentos

com camundongos em jejum, a ração foi retirada doze horas antes dos procedimentos experimentais. O presente projeto foi aprovado pelo CEUA da UEM (protocolo 3919220419).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 7 grupos (n= 7-10) conforme o seguinte delineamento experimental:

Grupo 1: controle (veículo - salina).

Grupo 2: controle LPS (5mg/Kg) + veículo

Grupo 3: LPS (5mg/Kg) + β -cariofileno 50 mg/kg.

Grupo 4: LPS (5mg/Kg) + β -cariofileno 100 mg/kg.

Grupo 5: LPS(5mg/Kg) + β -cariofileno 200mg/kg.

Grupo 6: LPS (5mg/Kg) + β -cariofileno 400mg/kg.

Grupo 14: LPS(5mg/Kg) + dexametasona oral (DEX, 1 mg/kg).

O β -cariofileno e a DEX (anti-inflamatório padrão) foram administrados por via oral (gavage). Os animais dos grupos controle e LPS receberam igual volume de solução fisiológica. Após uma hora, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 10 mg/Kg) e 5 mg/kg de LPS, em 50 μ L de solução salina estéril, foi administrado por via intranasal nos camundongos para induzir a LPA.

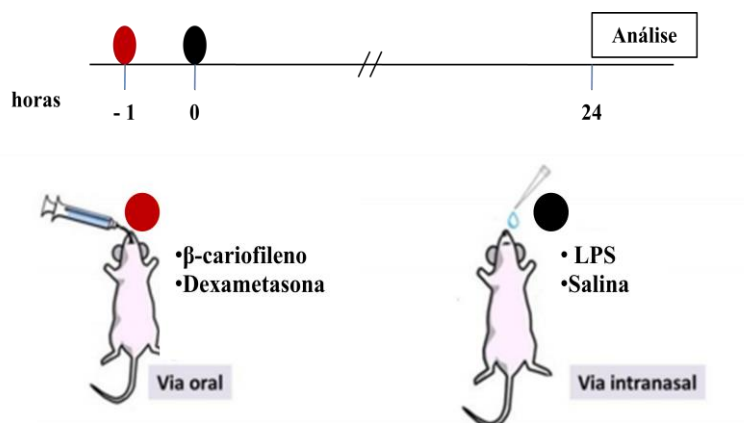


Figura 2. Representação do protocolo de pré-tratamento

Ensaio *in vivo*

Coleta do lavado broncoalveolar (LBA) e contagem celular

Vinte e quatro horas após a administração do LPS, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina. Em seguida, uma cânula traqueal será inserida via incisão médio-cervical e 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 LBA foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante removido e o precipitado ressuspenso em 0,5 mL de PBS. A contagem total de células foi realizada em câmara de Neubauer. Para contagem diferencial, as células foram centrifugadas em citocentrífuga e coradas com hematoxilina e eosina.

Determinação da razão peso úmido/seco do pulmão

Após 24 horas da administração de LPS, os animais foram eutanasiados, teve seus pulmões retirados e pesados. Em seguida, eles 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 e é importante para a avaliação do edema pulmonar.

Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar foi avaliada (indiretamente) pela atividade da enzima MPO. Após 24 horas da introdução intranasal de LPS, os animais serão eutanasiados, com overdose anestésica, e teve seus pulmões retirados. As amostras de tecidos pulmonares juntamente com tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil-amônio e EDTA (900µL/0,1mg de tecido) foi colocado para macerar. Após macerar, as células foram rompidas por choque térmico (nitrogênio líquido seguido de banho de 37°) e pelo sonicador (por 10 segundos). O homogenato foi centrifugado durante 5 minutos a 5.500 rpm. A atividade da enzima foi determinada pela técnica de cinética através da medida de absorbância (460 nm) por meio de um leitor Spectra Max Plus e registrada durante 120 seg. (LionhertDiagnostics® - ELX 800). O sobrenadante foi utilizada para o branco e para a análise da atividade, no qual utiliza 100 µL da amostra e 900 µL de uma solução tampão contendo dicloridrato de o-dianisidina (0,0085g), água bidestilada (45 mL), tampão fosfato de potássio 100mM (5 mL) e H₂O₂ 1% (25 µL).

Níveis de NO no lavado broncoalveolar

O nível de produção de NO foi monitorizado medindo o nível de nitrito no LBA por meio de reação de Griess. 100 µL da amostra (sobrenadante do LBA, coletado na forma descrito anteriormente) foi incubada com igual volume do reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico e 0,1% de cloridrato de N-1-naftiletilediamina em água) a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida a 550 nm com um leitor de placas de 96 poços. As concentrações de NO foram calculadas a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio. Os dados foram apresentados como a concentração de NO² em µM.

Dosagem de citocinas no LBA

As concentrações de citocinas nos sobrenadantes do lavado broncoalveolar foram medidas por meio do kit de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante.

Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando GraphPad Prism Software (versão 5.0). A significância estatística dos dados foi avaliada por ANOVA com teste de Tukey. O nível de 5% ($p < 0.05$) foi adotado como critério de significância. Análises estatísticas adicionais podem ser requeridas conforme posteriores análises.

RESULTADOS

Caracterização química do β-cariofileno natural

A caracterização detalhada do β-cariofileno natural isolado de botões de cravo foram realizadas por GC-MS no Centro de Investigação da Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, em Portugal, sob a supervisão da Dra. Lillian Barros.

Os resultados da análise estão apresentados na Tabela 1 e decompõem um pouco sobre a composição de 96,2% em β-cariofileno originalmente informada pelo fabricante.

Tabela 1. Composição química do β-cariofileno natural de cravo determinada por GC-MS. RT: tempo de retenção; LRI calc: índice linear de retenção calculado; * [Adams, 201].

Composto	RT	LRI calc	LRI teórico*	Média±DP (%)
Copaeno	35.89	1374	1374	0.7±0.1
β-Cariofileno	37.843	1419	1419	91.0±0.2

α -Cariofileno (humuleno)	39.229	1453	1452	8.2±0.1
-------------------------------------	--------	------	------	---------

Ensaio de quimiotaxia *in vitro* e viabilidade celular

Para verificar o efeito direto do β -cariofileno sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*, utilizou-se a câmara de Boyden como modelo experimental e fMLP 10^{-6} M como agente quimiotático. Nossos resultados mostraram que o fMLP estimulou significativamente a migração de neutrófilos quando comparados ao grupo controle (RPMI 1640). O tratamento com β -cariofileno, nas concentrações de 3, 10, 30, e 90 $\mu\text{g/mL}$, reduziu significativamente a migração de neutrófilos em 56,76%, 51,19%, 64,30% e 65,80%, respectivamente (Figura 3).

No ensaio de viabilidade celular *in vitro* pelo método de MTT avaliamos a atividade citotóxica dos compostos. O β -cariofileno foi testado nas concentrações de 3, 10, 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$, apresentando viabilidade celular de 98%, 88%, 97%, e 83%, respectivamente (Tabela 2).

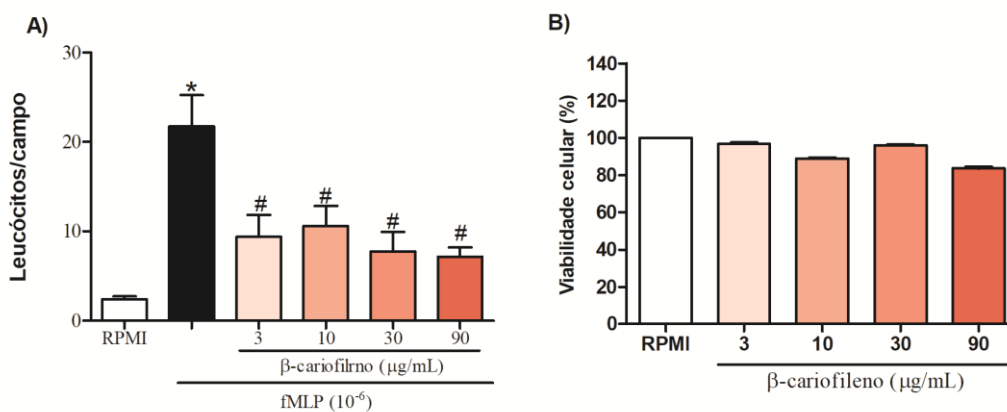


Figura 3. Efeito do β -cariofileno sobre A) a quimiotaxia de leucócitos e B) a viabilidade celular. Os leucócitos obtidos da cavidade peritoneal dos camundongos foram tratados com o β -cariofileno nas concentrações de 3, 10, 30, 90 $\mu\text{g/ml}$. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado ao RPMI (controle negativo). # $p < 0,05$ quando comparado ao fMLP (controle positivo). Os dados foram analisados usando o teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Ensaio de fagocitose *in vitro*

O efeito do β -cariofileno na fagocitose de neutrófilos foi avaliado. Nossos resultados mostram que o β -cariofileno, nas concentrações 3, 10, 30, e 90 $\mu\text{g/mL}$, reduziu significativamente a habilidade fagocítica dos neutrófilos em 55,63%, 65,35%, 42,87% e 39,17%, respectivamente (Figura 4).

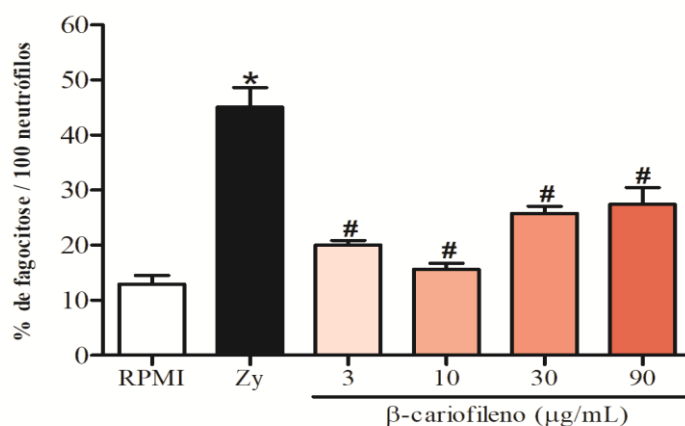


Figura 4. Efeito do do β -cariofileno sobre a atividade fagocitária de neutrófilos. Os neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal dos camundongos foram tratados com β -cariofileno nas concentrações de 3, 10, 30, 90 $\mu\text{g/ml}$ e posteriormente incubados com partículas de zymosan previamente opsonizadas. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado ao RPMI. # $p < 0,05$ quando comparado ao Zymosan (Zy). Os dados foram analisados utilizando o teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Indução da LPA com LPS e efeitos do β -cariofileno sobre a migração de leucócitos

Os efeitos do β -cariofileno de sobreamigração de neutrófilos no LBA foi avaliado 24 h após a administração do LPS. Após anestesiados com cetamina/xilazina, o LBA foi coletado e processado para a contagem de células totais e diferenciais, conforme descrito em métodos.

Os animais do grupo LPS apresentaram aumento significativo do número de neutrófilos 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 LPA. O pré-tratamento via oral com β -cariofileno nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg reduziram a migração em 34%, 38% e 35%, respectivamente (Figura 5A). Os grupos tratados com dexametasona apresentou uma redução no número de neutrófilos totais no LBA de aproximadamente 55%.

Em relação a análise das células diferenciais, foi observado que o número aumentado de neutrófilos no LBA dos animais desafiados com LPS está relacionado com a migração de células polimorfonucleares (PMN), e que a diminuição desse número após o tratamento com β -cariofileno é atribuída a inibição da migração de células PMN (Figura 5B). Tendo em vista que, após o tratamento com β -cariofileno (100, 200 e 400 mg/kg) houve redução (36,30%, 38,90% e 30,36% respectivamente) significativa no número de células PMN no LBA dos animais. Resultados semelhantes foram observados nos animais tratados com dexametasona.

cc

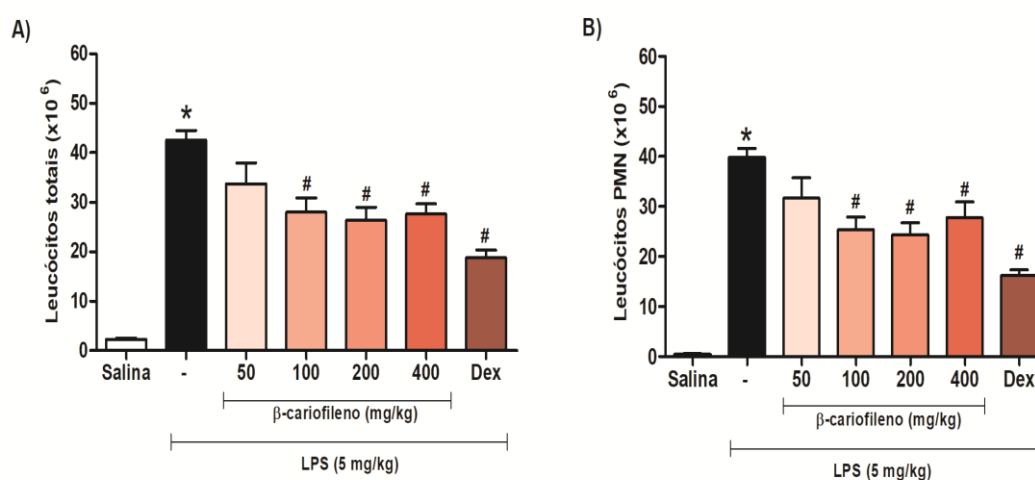


Figura 5. Efeito do tratamento com β -cariofileno na migração de neutrófilos totais e diferenciais para o espaço broncoalveolar na lesão pulmonar aguda induzida por LPS. (A) Número de células totais no LBA; (B) Número de células PMN no LBA. Os valores foram expressos com média \pm EPM. *P < 0.01 quando comparado ao grupo controle, #P < 0.01 comparado com grupo LPS

Ensaio da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A acumulação de neutrófilos no tecido pulmonar foi avaliada pela atividade da enzima MPO. Como pode ser observado na figura 6, o nível de atividade da MPO aumentou após a administração do LPS. Oprié-tratamento com β -cariofileno (100, 200 e 400 mg/kg) reduziu significativamente (44,64; 43,31 e 41,50% respectivamente) a atividade da MPO em comparação ao grupo LPS. Resultados semelhantes foram encontrados nos grupos tratados com Dex. Esses dados, juntamente com os resultados obtidos na contagem celular, sugerem que o β -cariofileno possui efeito anti-inflamatório na atenuação da migração de neutrófilos nos pulmões.

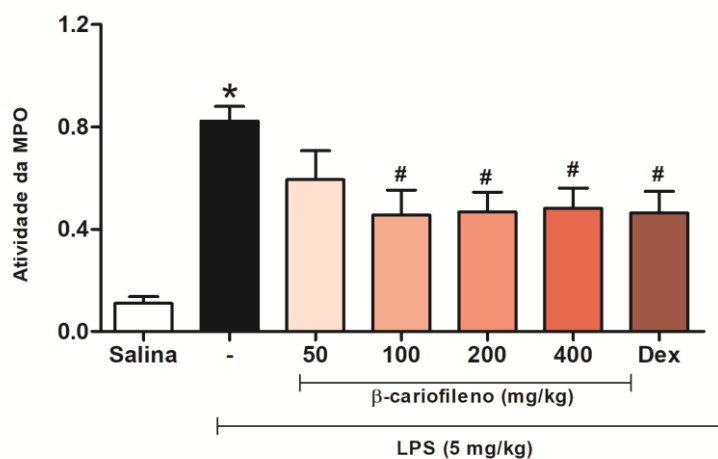


Figura 6. Efeito do pré-tratamento com β -cariofileno na atividade da enzima MPO. Os valores foram expressos com média \pm EPM. *P < 0.01 quando comparado ao grupo controle, #P < 0.01 comparado com grupo LPS.

Determinação da razão peso úmido/seco do pulmão

A LPA induzida por LPS é caracterizada por edema pulmonar. Neste estudo, avaliamos o edema pulmonar através da detecção da razão peso úmido/seco do pulmão. Como mostrado na Fig. 7, 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 β -cariofileno, na dose de 200 mg/kg, diminuiu significativamente (15%) a magnitude do edema pulmonar quando comparado com o grupo LPS. Os animais pré-tratados com Dex (anti-inflamatório padrão) apresentaram uma redução de 38% na formação do edema.

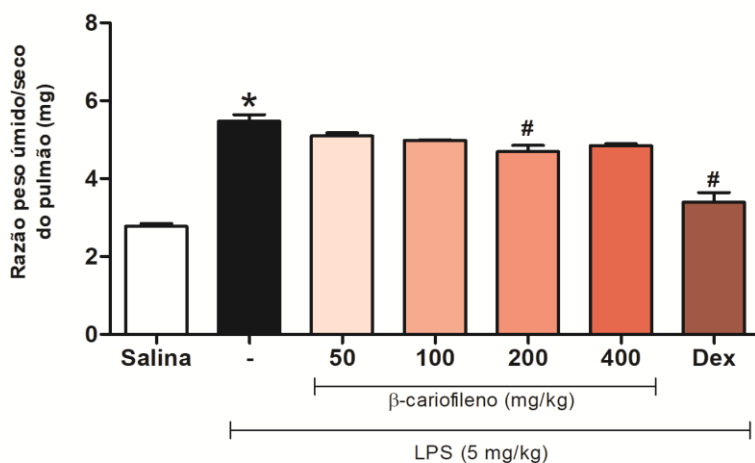


Figura 7. Efeito do pré-tratamento com β -cariofileno na razão peso úmido/seco do pulmão na lesão pulmonar aguda induzida por LPS. Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0.01$ quando comparado ao grupo controle, # $p < 0.01$ comparado com grupo LPS.

Determinação da concentração de óxido nítrico (NO) no LBA

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 8). Nos animais pré-tratados com β -cariofileno, nas doses de 50, 100, 200 e 400 mg/kg, os níveis de NO no LBA foram significativamente reduzidos em 32,25%, 43,75%, 41,85% e 40,58% respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados nos animais tratados com Dexametasona.

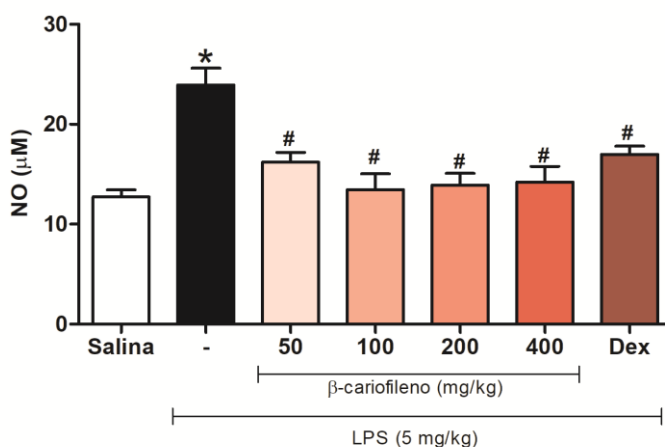


Figura 8. Efeito do pré-tratamento com β -cariofileno nos níveis de óxido nítrico no LBA. Os valores foram expressos com média \pm EPM. * $p < 0.01$ quando comparado ao grupo controle, # $p < 0.01$ comparado com grupo LPS.

Dosagem de citocinas no LBA

A administração intranasal de LPS promoveu um aumento nos níveis de IL-1 β no LBA. O pré-tratamento com β -cariofileno, na dose de 200 mg/kg, reduziu os níveis dessa citocina inflamatória. A dose de 200 mg/kg foi escolhida para dosagem de citocinas, pois mostrou-se mais efetiva em reduzir os parâmetros da LPA nesse modelo experimental.

Foi avaliado também os níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. A administração de LPS promoveu uma redução nos níveis de IL-10 no LBA (Figura 9A). O pré-tratamento com β -cariofileno, na dose de 200 mg/kg, mostrou-se capaz de aumentar os níveis dessa citocina (Figura 9B).

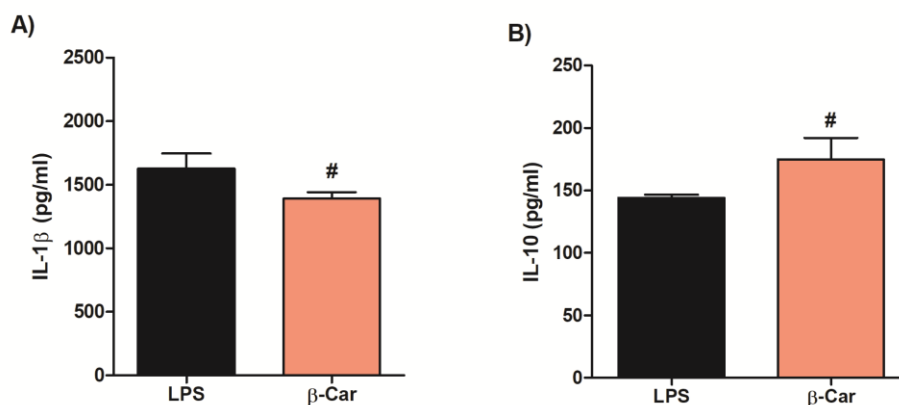


Figura 9. Efeito do pré-tratamento com β-cariofileno nos níveis de citocinas no tecido pulmonar. Os valores foram expressos com média ±EPM. #p< 0.01 quando comparado ao grupo LPS.

DISCUSSÃO

A inflamação é um componente importante em várias patologias a exemplo da LPA que é uma doença inflamatória de incidência mundial, com elevadas taxas de morbimortalidade(Mathay et al., 2003; Jiang et al., 2017). O modelo de LPA induzida por LPS foi confirmado como um modelo adequado para estudar as potenciais estratégias terapêuticas que podem ser usadas no tratamento da LPA em humanos [Rojas et al., 2005]. No estudo atual, investigamos o impacto do pré-tratamento com β-cariofileno na LPA induzida por LPS. Os resultados demonstraram uma potencial atividade anti-inflamatória do β-cariofileno na LPA, pois atenuou significativamente a infiltração de células inflamatórias, o edema pulmonar, os níveis de NO e o aumento da liberação de citocinas inflamatórias.

Inicialmente foi avaliado o efeito direto do β-cariofileno sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*, utilizando a câmara de Boyden como modelo experimental e fMLP 10^{-6} M como agente quimiotático. O fMLP está relacionado com a ativação de diferentes vias que levam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, IL-8 e TNFα, as quais estimulam a migração de neutrófilos(Fujita et al., 2005). Ao migrarem para o sítio inflamatório, os neutrófilos participam especialmente da eliminação de patógenos, através de diferentes mecanismos, como a fagocitose e a formação de NETs(neutrophil extracellular traps)(Dorhmann et al., 2016; Teng et al., 2017; Hellebreck

et al., 2017; Manda-Handzlik et al., 2019). Embora os neutrófilos desempenhem papel essencial na resposta inflamatória, sua migração e resposta desregulada desencadeiam danos teciduais e a persistência da inflamação (Cano et al., 2016; Su et al., 2020). Nossos resultados mostraram que o β -cariofileno, em todas as doses testadas, promoveu uma redução significativa na quimiotaxia de neutrófilos em resposta à estimulação do fMLP (Figura 3A). Uma vez que o tratamento com o β -cariofileno não afetou a viabilidade dos leucócitos, avaliada por meio do ensaio de citotoxicidade, pode ser sugerido que o efeito direto do β -cariofileno na inibição da migração de neutrófilos não está relacionado à toxicidade (tirar o não parece, inferir, afirmar) (por exemplo, morte celular).

Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio inflamatório e seu principal mecanismo para eliminação de patógenos é a fagocitose, processo no qual englobam os microrganismos em um fagossomo, que se funde com grânulos intracelulares para formar um fagolisossomo. No fagolisossomo, os microrganismos são mortos após a exposição a enzimas proteolíticas, peptídeos antimicrobianos e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (Dorhmann et al., 2016; Teng et al., 2017). Apesar da fagocitose ser essencial na eliminação de patógenos, as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que são produzidas neste processo podem provocar dano tecidual (Hellebreck et al., 2017; Manda-Handzlik et al., 2019). Uma vez que a atividade fagocitária é uma das funções mais importantes dos neutrófilos, o efeito do β -cariofileno na fagocitose de neutrófilos foi avaliado. Nossos resultados demonstraram que o β -cariofileno, nas concentrações 3, 10, 30, e 90 $\mu\text{g/mL}$, reduziu significativamente a habilidade fagocítica dos neutrófilos (Figura 4). Sendo assim, os efeitos inibitórios do β -cariofileno sobre a fagocitose de neutrófilos são importantes no contexto da redução dos danos teciduais que podem ser causados pela inflamação.

A infiltração excessiva e o acúmulo de leucócitos, em especial dos neutrófilos, são uma das marcas patológicas mais importantes da LPA e desempenham um papel crucial no desenvolvimento da doença (Grommes e Soehnlein, 2011). Durante a LPA, os neutrófilos extravasam e migram para o espaço alveolar, onde secretam quimioatraentes, como o LTB_4 , e recrutam mais neutrófilos amplificando assim a resposta inflamatória. O recrutamento excessivo de neutrófilos pode resultar em lesão adicional ao tecido pulmonar pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), NO, proteases e citocinas pró-inflamatórias (Brattacharya e Matthay, 2013; Li et al., 2016). Clinicamente, o número de células inflamatórias no LBA de pacientes com LPA

se correlaciona intimamente com a gravidade da doença (Abrahan, 2003). O presente estudo demonstrou que a administração intranasal de LPS induziu significativamente a migração de células inflamatórias para os pulmões, principalmente neutrófilos. Por outro lado, o pré-tratamento com o β -cariofileno, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, diminuiu acentuadamente o influxo de células inflamatórias induzido por LPS para os pulmões.

O aumento expressivo dos neutrófilos totais, majoritariamente de neutrófilos, também foi observado no tecido pulmonar, demonstrado através da maior atividade da enzima MPO (Figura 6). A MPO, uma enzima estocada nos grânulos citoplasmáticos de neutrófilos, tem papel importante na produção de espécies reativas de oxigênio, e a sua atividade reflete a infiltração de neutrófilos nos tecidos (Klebanof, 2005). Como esperado, o β -cariofileno reduziu a atividade da enzima MPO no tecido pulmonar. O efeito do β -cariofileno na redução da migração de neutrófilos já foi documentado em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa. Em modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freud, foi constatado que o tratamento com β -cariofileno por 18 dias consecutivos, diminuiu o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular, o número de neutrófilos no sangue e a atividade da enzima MPO (Ames-Sibin et al., 2018). Em paralelo, durante o processo inflamatório o catabolismo do óxido nítrico (NO) constitui uma importante fonte de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (VanderVliet; Cross, 2000). O grupo LPS apresentou significativo aumento dos níveis de NO (nitrito/nitrato) em comparação ao grupo controle. O β -cariofileno, em todas as doses testadas inibiu a produção de NO.

A inflamação ocorrida durante a lesão pulmonar aguda provoca aumento da permeabilidade e edema pulmonar, uma das principais características da LPA (Ware e Matthay, 2000). Nós observamos que o tratamento com o β -cariofileno, na dose de 200 mg/kg atenuou o desenvolvimento do edema pulmonar, como determinado pela redução da razão peso seco/úmido do pulmão. A ação antiedematogênica do β -cariofileno já foi demonstrado em modelos de inflamação aguda e crônica, onde o β -cariofileno promoveu redução do edema de pata induzida por carragenina, dextrana e adjuvante completo de Freud (Dahham et al., 2015; Oliveira-Tintino et al., 2018; Ames-Sibin et al., 2018).

Durante a LPA ocorre um aumento na liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como as citocinas que desempenham papel importante durante o processo inflamatório pulmonar e estão intimamente associadas à presença de leucócitos,

principalmente neutrófilos, no local inflamado (Dinarello, 2007; Matute-Bello et al., 2011; Fujishima, 2014). Neste modelo, o estímulo ao LPS resultou em expressão aumentada de IL-1 β , a qual foi inibida pelo tratamento com β -cariofileno (Figura 9A). Com relação a citocina pró-inflamatória IL-10, a administração intranasal de LPS promoveu uma redução nos níveis dessa citocina, os quais foram aumentadas pelo tratamento com β -cariofileno (Figura 9B). Corroborando com nossos resultados, estudos prévios já demonstraram β -cariofileno reduziu os níveis de interleucinas (IL-6 e IL-1 β) e de TNF- α em modelos de neuroinflamação (Guo et al., 2014; Ojha et al., 2016) e mostrou-se eficaz em inibir a via de sinalização do NF- κ B (Li et al., 2020). Desta forma, podemos sugerir que a ação do β -cariofileno em atenuar o processo inflamatório que acontece na LPA parece estar relacionado a inibição de citocinas e interleucinas essenciais para o processo inflamatório.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que o β -cariofileno isolado com óleo de cravo apresenta grau de pureza de 91% e o α -cariofileno (humuleno) também é um importante componente do produto.

O β -cariofileno reduziu a quimiotaxia dos neutrófilos *in vitro* e a fagocitose de neutrófilos em baixas concentrações, no qual não modificou a viabilidade celular. O β -cariofileno administrado por via oral foi eficaz em diminuir o recrutamento de neutrófilos e os níveis de NO no LBA, atenuar o edema pulmonar, reduzir a atividade da enzima MPO e os níveis de IL- β no tecido pulmonar.

Em conclusão, nossos resultados demonstram que o β -cariofileno possui atividade anti-inflamatória na LPA e que este efeito está relacionado a inibição de citocinas e interleucinas essenciais para o processo inflamatório, porém são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de ação do β -cariofileno.

REFERÊNCIAS

Adams RP. (2017). Identification of Essential oil components by Gas chromatography/Massspectrometry. Allured Publishing, ed. 4.1, Carol Stream, IL, USA; 804 pp.

Andrade-Silva M, Correa LB, CandéaALP,Cavalher-Machado SC, Barbosa HS, Rosas EC, Henriques MG. The cannabinoid 2 receptor agonist β -caryophyllene modulates the inflammatory reaction induced by *Mycobacterium bovis* BCG by inhibiting neutrophil migration. *Inflamm. Res.* 65 (2016) 869–879. <https://doi.org/10.1007/s00011-016-0969-3>

Ames-Sibin AP, Barizão CL, Castro-Ghizoni CV, Silva FMS, Sá-Nakanishi AB, Bracht L, Bersani-Amado CA, Marçal-Natali MR, BrachtA, & Comar JF. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(12), 10262–10277.<https://doi.org/10.1002/jcb.27369>

Bento A, Marcon R, Dutra R, Claudino R, Cola M, Pereira Leite D, Calixto J. β -Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway. *Am. J. Pathol.* 178 (2011) 1153-1166.<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.052>

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, pp. 818-824, 1994

Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 115 (1962) 453-466.<https://doi.org/doi:10.1084/jem.115.3.453>

Bhattacharya J and Matthay M A. Regulation and Repair of the Alveolar-Capillary Barrier in Acute Lung Injury. *Annual Review of Physiology* 2013 75:1, 593-615

Calleja MA, Vieites JM, Montero-Meléndez T, Torres MI, Faus MJ, Gil A, Suárez A. 2013. The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *Br. J. Nutr.* 109 (2013) 394-401.<https://doi.org/10.1017/S0007114512001298>

Cano, P.M., Vargas, A., Lavoie, J.P., 2016. A real-time assay for neutrophil chemotaxis. *BioTechniques*. 60(5), 245–251.

Capelozzi, V. L. Entendendo a estrutura microscópica e submicroscópica da barreira alvéolo-capilar na lesão pulmonar aguda. *Pulmão*, vol. 20, n. 1, pp. 24-30, 2011.

Dambrova, M.; Zejniece, I.; Skapare, E.; et al. The antiinflammatory and antinociceptive effects of NF-kB inhibitory guanidine derivative ME10092. **IntImmunopharmacol**, vol. 10. n. 45,2010

Dahham, S.S., Tabana, Y.M., Ahamed, M.B.K., Majid, A.M.S.A., 2015. In vivo anti-inflammatory activity of β -caryophyllene, evaluated by molecular imaging. *Molecules Med. Chem.* 1, e1001.

Dinrello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol.* 2007 Nov;37 Suppl1:S34-45.

Dolinay, T.; Kim, YS; Howrylak, J.; Hunninghake, GM.; An, G. H.; Fredenburgh, I.; Massaro, AF; Rogers, A.; Gazourian, I.; Nakahira, K., Haspel, JA; Landazury, R.; Eppanapally, S.; Christie, JD.; Meyer, NJ.; Ware, LB; Christiani, DC; Ryter, SW; Baron, RM; Choi, AMK. inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. **american journal of respiratory and critical care medicine**, vol. 185, pp. 1225 – 1234, 2012.

Döhrmann, S., Cole, J.N., Nizet, V., 2016. Conquering Neutrophils. *PLoS Pathog.* 12(7), e1005682.

Fernandes E, Passos G, Medeiros R, da Cunha F, Ferreira J, Campos M, Pianowski L, Calixto J. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur. J. Pharmacol.* 569 (2007) 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.04.059>

Fujishima S. Pathophysiology and biomarkers of acute respiratory distress syndrome. *J Intensive Care.* 2014;2(1):32.

garcia, C. S. N. B.; Pelosi, P. Diferenças entre as formas pulmonares e extrapulmonares na síndrome do desconforto respiratório agudo, n. 20, vol.1, pp.19-23, 2011.

Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen J-Z, Xie X-Q, Altmann K-H, Karsak M, Zimmer A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc. Nat. Ac. Sci.* 105 (2008) 9099–9104.

Grommes, J.; Soehnlein, O. Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury. **Journal of Molecular Medicine**, vol.17, pp.293 - 307, 2011.

Guo, K., Mou, X., Huang, J., Xiong, N., Li, H., 2014. Trans-caryophyllene suppresses hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- κ B activation in microglia. *J. Mol. Neurosci.* 54(1), 41-48.

Hellebrekers, P., Hietbrink, F., Vrisekoop, N., Leenen, L.P.H., Koenderman, L., 2017. Neutrophil Functional Heterogeneity: Identification of Competitive Phagocytosis. *Front. Immunol.* 8, 1498.

Jiang K., Zhang T., Yin N., Ma X., Zhao G., Wu H., Qiu C., Deng G. Geraniol alleviates LPS-induced acute lung injury in mice via inhibiting inflammation and apoptosis. *Oncotarget.* 2017; 8: 71038-71053.

Jung DH, Park MH, Kim CJ, Lee JY, Keum CY, Kim IS, Yun C-H, Kim S, Kim WH, Lee YC. Effect of β -caryophyllene from cloves extract on *Helicobacter pylori* eradication in mouse model. *Nutrients* 12 (2020) 1000.

Kielian, T. L.; Blecha, F. CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review. **Immunopharmacology**, vol. 29, pp.187–205, 1995.

Li L, Huang Q, Wang Dc, Ingbar Dh, Wang X. Acute lung injury in patients with COVID-19 infection. *Clin Transl Med.* 2020 10(1):20-27. <https://doi.org/10.1002/ctm2.16>

Li Y, Huang J, Foley NM, Xu y, Pan J, Paul Redmond H, Wang JH, Weng J B7H3 ameliorates LPS-induced acute lung injury via attenuation of neutrophil migration and infiltration. *ScientificReports*, vol 6, 2016

Liu H, Song Z, Liao D, Zhang T, Liu F, Zhuang K, Luo K, Yang L. Neuroprotective effects of trans-caryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice. *Neurochem. Res.* 40 (2015) 118-23. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1474-0>

Maffei, ME. Plant natural sources of the endocannabinoid (E)- β -caryophyllene: a systematic quantitative analysis of published literature. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 6540. <https://doi.org/10.3390/ijms21186540>

Manda-Handzlik, A., Bystrzycka, W., Cieloch, A., Glodkowska-Mrowka, E., Jankowska-Steifer, E., Heropolitanska-Pliszka, E., Skrobot, A., Muchowicz, A., Ciepiela, O., Wachowska, M., Demkow, U., 2020. Nitric oxide and peroxynitrite trigger and enhance release of neutrophil extracellular traps. *Cell. Mol. Life Sci.* 77(15), 3059-3075. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03331-x>.

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.

Medeiros R, Passos GF, Vitor CE, Koepp J, Mazzuco TL, Pianowski LF, Campos MM, Calixto JB. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br. J.Pharmacol.* 151 (2007) 618–627. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707270>

Nurdjannah N, Bermawie N. Cloves. In: Peter KV, Editor. *Handbook of Herbs and Spices*, second edition, vol.1. WoodheadPublishinglimited, p. 197-215, 2012. <https://doi.org/10.1533/9780857095671.197>

Oliveira-Tintino, C., Pessoa, R.T., Fernandes, M., Alcântara, I.S., Silva, B., Oliveira, M., Martins, A., Silva, M., Tintino, S.R., Rodrigues, F., Costa, J., Lima, S.G., Kerntopf, M. R., Silva, T.G., Menezes, I., 2018. Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. *Phytomedicine.* 41, 82-95.

Ojha, S., Javed, H., Azimullah, S., Haque, M.E., 2016. β -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. *Mol. Cell. Biochem.* 418, 59-70. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2733-y>.

Parsons, P. E.; Eisner, M. D.; Thompson, B. T.; Matthay, M. A.; Ancukiewicz, M.; Bernard, G. R.; Wheeler, A. P. The NHLBI Acute Respiratory Distress Syndrome Clinical Trials Network. Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury*. *Critical Care Medicine*, vol.33, n.1, pp.1-6, 2005

Shelton, J. L.; Wang, L.; Enpiskas, G.; et al. Inducible NO synthase (iNOS) in human neutrophils but not pulmonary microvascular endothelial cells (PMVEC) mediates septic protein leak in vitro. *Microvasc Res*, vol. 74, n. 23, 2007.

Su, Y., Gao, J., Kaur, P., Wang, Z., 2020. Neutrophils and Macrophages as Targets for Development of Nanotherapeutics in Inflammatory Diseases. *Pharmaceutics*. 12(12), 1222. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121222>.

RUBENFELD, G. D; Caldwell, E.; Peabody, E.; Weaver, J.; Martin, D. P.; Neff, M.; Stern, E. J.; Hudson, L. D. Incidence and outcomes of acute lung injury. *New England Journal of Medicine*, n.353; pp.1685– 1693; 2005.

Tasaka, S.; Hasegawa, N.; Shizaka, A. Pharmacology of acute lung injury. ***Pulmonary Pharmacology & Therapeutics***, vol. 15, pp. 83-95, 2002.

Teng, T.S., Ji, A.L., Ji, X.Y., Li, Y.Z., 2017. Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *J. Immunol. Res.* 2017, 9671604. <https://doi.org/10.1155/2017/9671604>

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. 463–178, pp. 473, 2007

Tsushima, K.; King, L. S.; Aggarwal, N. R.; Gorordo, A.; D'Alessio, F. R.; Kubo, K. Acute Lung Injury Review. *Inter Med.*, n. 48, pp. 621-630, 2009. DOI: 10.2169/internalmedicine.48.1741.

Ware, L. B.; Matthay, M. A. The acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*, n.342, vol.18, pp.1334-49, 2000.

Ware, L. B. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, n. 27, vol. 4, pp.337-49, 2006.

Widayat W, Hadiyanto H, Cahyono B, Ngadiwiyanana N. Optimization of eugenol extraction from clove oil using response surface methodology. *Modern Appl Sci* 9 (2015) 68. <https://doi.org/10.5539/mas.v9n11p68>

Zamboni, M.; Vincent, J. L. Mortality rates for patients with acute lung injury=ARDS have decreased over time. *Chest*, n.133, pp.1120–1127; 2008.

Zhang, X.; Huanh, H.; Yang, T.; Ye, Y.; Shan, J.; Yin, Z.; Luo, L. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. ***Injury*** vol. 41, pp. 746–752, 2010