

## EFEITO DO EUCALIPTOL SOBRE A CAPACIDADE FAGOCÍTICA E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) DE MACRÓFAGOS

EDUARDA KUNRATH MEYER<sup>1</sup>; EDUARDA DA SILVA HENZ<sup>2</sup>; TONY PICOLI<sup>2</sup>;  
MARLETE BRUM CLEFF<sup>2</sup>; SILVIA DE OLIVEIRA HUBNER<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – [eduarda.meyer.98@hotmail.com](mailto:eduarda.meyer.98@hotmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – [eduardahenz@hotmail.com](mailto:eduardahenz@hotmail.com); [picolivet@gmail.com](mailto:picolivet@gmail.com);  
[marletecleff@gmail.com](mailto:marletecleff@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – [silviaoliveirahubner@gmail.com](mailto:silviaoliveirahubner@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O eucaliptol, também conhecido como 1,8-cineol (fórmula molecular C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O) é um monoterpene de grande índice terapêutico de ocorrência natural em muitas plantas aromáticas. É muito utilizado na terapia popular para tratamento de bronquite, sinusite e asma. Há poucos estudos com referência ao seu papel imunomodulador.

A fagocitose é um processo realizado pelos macrófagos onde há o englobamento e digestão de partículas. Esse processo é estimulado por produtos bacterianos, produtos da ativação do complemento e moléculas liberadas pelas células e tecidos danificados. Dessa forma, é importante na remoção de células mortas e em processo de morte.

Os macrófagos quando expostos a compostos de origem microbiana ou agentes quimiotáticos, principalmente em roedores, bovinos, humanos, ovinos, caprinos e equinos, originam uma enzima capaz de produzir grandes quantidades de óxido nítrico e citrulina, a sintase de óxido nítrico. Essa enzima atua sobre a L-arginina, um aminoácido, com o auxílio de NADPH e oxigênio para produzir esses compostos.

A produção contínua de NO permite que macrófagos matem eficientemente bactérias, fungos, protozoários, alguns helmintos e células tumorais. O óxido nítrico liga-se a enzimas contendo metal, como as redutases ribonucleotídeos, que impedem a sintase de DNA. Também bloqueia as enzimas respiratórias contendo hemo (grupamento que contém ferro) mitocondrial (TIZARD, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar se o eucaliptol é capaz de afetar a produção de óxido nítrico de macrófagos peritoneais de camundongo e ou a habilidade fagocítica de macrófagos de linhagem RAW 264.7.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Células RAW 264.7 e Macrófagos peritoneais

As células de linhagem RAW 264.7, foram gentilmente cedidas pela Embrapa Suínos e Aves (Concórdia). Os macrófagos peritoneais foram obtidos após lavado peritoneal em camundongos Suíços, machos, adultos (10 ml de PBS's por animal). A suspensão celular do lavado foi centrifugada a 500xg por 10 minutos a 4°C. Para os experimentos, as células foram distribuídas na concentração de 10<sup>5</sup> macrófagos/ poço em microplacas. Após aderência de 1h a 37°C, as células foram lavadas e mantidas a 37°C com modified Eagle's medium (MEM) acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB), em atmosfera úmida contendo 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). A viabilidade foi avaliada utilizando solução de Azul de Trypan em câmara de Neubauer.

## 2.2 Avaliação da produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais ( $10^5$  células/poço), pelo método de Griess, mantidos na presença/ausência de eucaliptol (0.63, 0.5 e 0.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) associado a LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24h em estufa  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . Para medir a produção de nitrito, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  das amostras foram incubadas com 100  $\mu\text{L}$  dos reagentes (50  $\mu\text{L}$  da solução de sulfanilamida 1% e 50  $\mu\text{L}$  de solução de dicloridrato de naftil-1-n-etilenodiamina 0,1% em 2,5% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) à temperatura ambiente por 10 minutos no escuro. A leitura foi realizada no espectrofotômetro com absorvância de 550nm. A concentração de nitrito total foi determinada por comparação com curva padrão de  $\text{NaNO}_2$ . Como controle negativo foi usado sobrenadante da cultura de macrófagos não tratado e não estimulado com LPS e como controle positivo macrófagos estimulados com LPS e não tratados.

## 2.3 Avaliação da fagocitose

Células RAW 264.7 ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram colocadas em microplacas e mantidas por 2h a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , após o que o sobrenadante foi removido e foi adicionado eucaliptol nas diferentes concentrações (0.63, 0.5 e 0.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) associado a LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) no volume de 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ . Após 24h adicionou-se 10  $\mu\text{L}/\text{poço}$  da solução de fagocitose (0,3 mL da solução de vermelho neutro a 0,02g/mL de DMSO e 0,02 g de zimosan não opsonizado em 3 mL de PBS) e incubou-se por 45 minutos. A seguir, as células foram lavadas com PBS, a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitados e foi adicionado 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$  do Fixador de Baker. Reservou-se a placa, durante 30 minutos, em temperatura ambiente, logo após, adicionou-se 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de solução de extração: ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etanol PA (50% v/v). Após solubilização as absorvâncias foram medidas a 550 nm.

Os dados foram relatados pela média  $\pm$  desvio padrão e avaliado por análise de variância One-Way ANOVA, sendo considerado significativo  $p < 0,05$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óxido nítrico é gerado por macrófagos, como parte da resposta imune contra patógenos fagocitados. Os macrófagos possuem a enzima óxido nítrico sintetase (iNOS), que ao ser ativada, principalmente por citocinas como o interferon-gama ( $\text{IFN-}\gamma$ ), resulta na síntese de NO. NO é tóxico para bactérias e parasitas intracelulares, contribuindo na destruição dos patógenos fagocitados, além de ser capaz induzir apoptose de células tumorais (Dusse et al 2003). No presente estudo, foi possível constatar que o tratamento com eucaliptol associado ao LPS por 24h resultou na produção de uma quantidade significativamente maior de NO ( $p < 0,05$ ), como pode ser observado no gráfico plotado a seguir. A maior produção de NO nas células tratadas indica que o eucaliptol exerce um papel estimulador de macrófago.

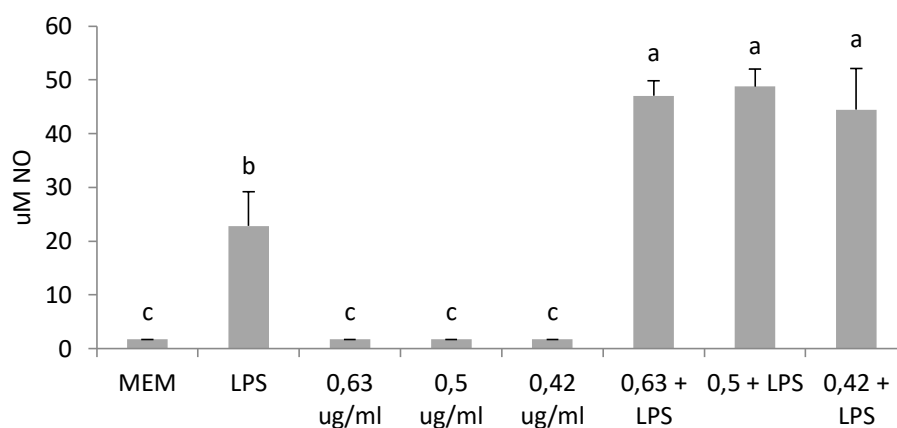


Figura 1. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) mediante a dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados com eucaliptol, eucaliptol associado a LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*) ou somente LPS.

De modo semelhante, foi detectada uma atividade estimulante de fagocitose nos macrófagos tratados com eucaliptol por 24 h. O ensaio de determinação da capacidade fagocítica utilizando-se o corante vermelho neutro e partículas de zimosan coradas realizado com os macrófagos RAW 264.7 mostrou um aumento significativo da capacidade fagocítica das células, nas maiores concentrações, como pode ser observado na figura a seguir.

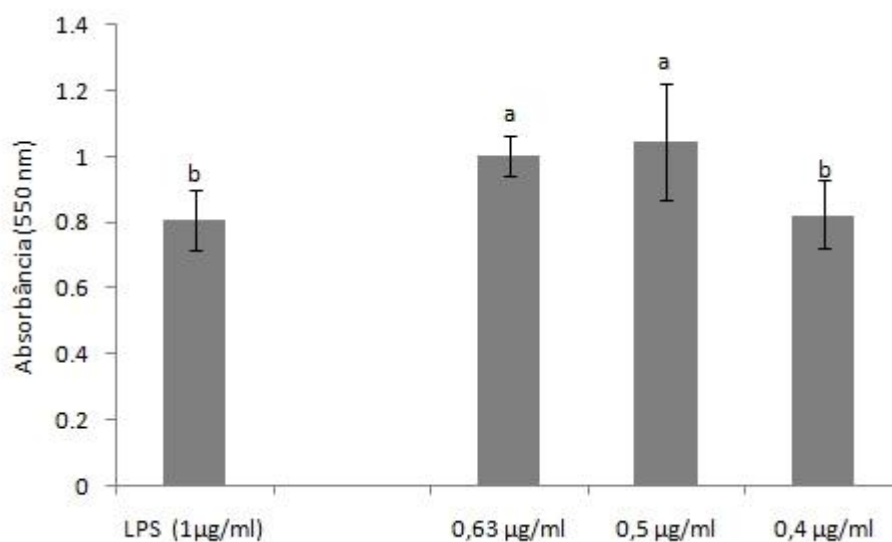


Figura 2. Determinação da fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos RAW 264.7 tratados com eucaliptol. Valores expressos como média das absorbâncias/2X10<sup>5</sup> células.

O efeito imunoestimulador do macrófago exercido pelo eucaliptol será futuramente investigado utilizando diferentes abordagens *in vitro* e *in vivo* para validar os resultados obtidos, assim como determinar os mecanismos pelos quais essa substância exerce o efeito em macrófagos.

#### 4. CONCLUSÕES

A investigação dos parâmetros de ativação de macrófagos indica que o eucaliptol promove o incremento na produção de óxido nítrico e na capacidade fagocítica de macrófagos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DUSSE, Luci Maria Sant'ana; VIEIRA, Lauro Mello; CARVALHO, Maria das Graças. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.343-350, 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442003000400012>.

HIBBS, John B. et al. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 157, n. 1, p.87-94, nov. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x\(88\)80015-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x(88)80015-9).

SOUTO, Ingrid Carneiro Cavalcante et al. Atividades farmacológicas do monoterpreno 1,8-cineol: um estudo in silico. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, Pombal, v. 3, n. 6, p.26-28, jul-set 2016. <https://doi.org/10.18378/rebes.v6i3.4442>.

NELO, Bernardo Melo. **EFEITO DO EXTRATO E FRAÇÕES DE Zanthoxylum rhoifolium Lam. E DA RESINA DE Protium heptaphyllum (Aubl.) March. SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR Leishmania amazonensis**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

SERAFINO, Annalucia et al. Stimulatory effect of Eucalyptus essential oil on innate cell-mediated immune response. **Bmc Immunology**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.17, abr. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2172-9-17>.

TIZARD, Ian R. Imunidade inata: macrófagos. In: TIZARD, Ian R. **Imunologia Veterinária: Uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. Cap. 4. p. 28-31.