

EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO AMBÍGUO DO ÓLEO DE *COPAIFERA LANGSDORFFII* NO PERFIL DE MIGRAÇÃO CELULAR À CORPO ESTRANHO.

VIEIRA, Rafael Costa; **SILVA**, Heloísa Helena Garcia; **BOMBARDIERI**, Ethiane; **OLIVEIRA**, Julierme José; **BRITO**, Luiz Augusto Batista; **JUNQUEIRA-KIPNIS**, Ana Paula.

Palavras chaves: *Copaifera langsdorffii*, migração celular, antiinflamatório, célula gigante

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras drogas são usadas na medicina convencional como antiinflamatórios. Com os avanços nos campos da biologia celular e molecular essas drogas tornam-se cada vez mais eficientes. Por outro lado, as plantas medicinais, usadas na medicina alternativa, são usadas de maneira abrangente, porém muitas vezes, o seu uso baseia-se apenas em conhecimentos populares, faltando o suporte de evidências experimentais que comprovem a sua eficácia.

As observações populares sobre o uso dessas plantas contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais. Apesar de não terem todos os seus constituintes químicos conhecidos, esses vegetais são prescritos com frequência devido aos efeitos medicinais que produzem. Dessa forma, os usuários de plantas medicinais, tornam válidas informações medicinais que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL et al. 2002).

Estudos que visam à comprovação da autenticidade das informações populares estão sendo continuamente desenvolvidos, de forma que ao longo do tempo, uma gama de drogas de origem vegetal, inicialmente restritas ao uso popular e até mesmo considerada tóxica, está sendo incorporada ao arsenal terapêutico (FREIRE, 1992).

A *Copaifera langsdorffii*, juntamente com outras espécies do mesmo gênero, são conhecidas popularmente no Brasil como “copaibeiras” ou pau-d’óleo por exsudarem do seu tronco um óleo-resina. Sua utilização como agente antiinflamatório e cicatrizante, é reportada desde o século XVI, quando os primeiros colonizadores das Américas relataram que as índias aplicavam este óleo no cordão umbilical dos recém-nascidos e os guerreiros após as batalhas, em seus ferimentos. É do domínio da lenda que o conhecimento das propriedades medicinais do óleo de copaíba pelos índios, adveio da observação de que animais quando feridos esfregavam-se nos troncos das copaibeiras para cicatrizarem suas feridas (SALVADOR, 1975).

Os óleos de copaibeiras são usados para uma variedade de aplicações terapêuticas tais como: estimulante, diurético, laxativo, expectorante, cicatrizante, antitetânico, anti-hemorragico, anti-reumático, anti-ulcerogênico, anti-séptico do aparelho urinário, tratamentos de bronquites, urticárias e também como antiinflamatório (SALVADOR, 1975; BASILE et al., 1988; PAIVA et al., 2002). Mesmo assim, diante de tantas aplicações terapêuticas desses óleos, os estudos farmacológicos descritos até o momento são muito reduzidos (MACIEL et al. 2002).

Os modelos usados normalmente para avaliar a atividade antiinflamatória aguda são, na maioria das vezes, os testes de edema de orelha e patas de

camundongos, induzidos pela administração de carragenina e a atividade antiinflamatória crônica pelo teste de implantação de pequenos chumaços de algodão nas axilas, como foram realizados por BIGHETTI et al. (1999).

O presente trabalho teve como objetivo verificar o perfil de migração celular para corpo estranho e avaliar a atividade antiinflamatória após o tratamento com *Copaifera langsdorffii* utilizando a implantação de lamínula no tecido subcutâneo de camundongos, como indutor de inflamação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Escolha das plantas medicinais. *Copaifera langsdorffii* (copaibeira), foi escolhidas por ser amplamente usada em tratamentos tópicos que visam efeitos antiinflamatórios. O óleo foi adquirido no Laboratório de Bioatividade de Plantas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) UFG, depois de terem sido devidamente identificados e submetidos a testes biológicos.

2.2 Seleção e aclimatização dos animais. Os animais foram selecionados no biotério de criação da UFG. Eram camundongos isogênicos, machos, saudáveis e com idades entre 6 e 8 semanas. Os animais foram alojados em caixas plásticas apropriadas, forradas com maravalha, receberam água e ração balanceada de forma *ad libitum* e foram mantidos em condições ambientais apropriadas, evitando situações de estresse e risco sanitário.

2.3 Divisão dos grupos experimentais. Foram utilizados 60 animais, sendo 12 animais para cada ponto experimental (P1, P3, P5, P7 e P14) divididos em 4 grupos de tratamentos. Um grupo controle que não recebeu tratamento tópico, um tratado apenas com glicerina, outro com óleo e glicerina na proporção de 1:1 e por fim um último grupo tratado com o óleo puro. O tratamento tópico foi realizado diariamente (período da manhã) durante o tempo experimental, utilizando um pincel previamente esterilizado.

2.4 Anestesia dos animais. Os animais foram anestesiados com Cloridrato de 2-5,6-dihidro-4H-1,3-Tiazina e Cloridrato de cetamina. As concentrações anestésicas foram de acordo com as recomendações fornecidas pelos fabricantes.

2.5 Implante das lamínulas. Após a incisão transversal de aproximadamente 1cm no plano dorsal da região torácica e separação da pele, cada animal recebeu por via subcutânea uma lamínula circular (12mm / 22x22). Momentos antes de implantar no tecido conjuntivo subcutâneo, a lamínula foi mergulhada no álcool 70%. Após o implante a incisão cirúrgica foi suturada com fio de nylon e recebeu o tratamento, de acordo com o protocolo estabelecido.

2.6 Extração das lamínulas e Montagem da lâmina. As extrações das lamínulas foram realizadas nos dias 1, 3, 5, 7 e 14 (pontos experimentais). Os animais foram mortos por deslocamento cervical e imediatamente após, a lamínula era retirada. As lamínulas foram lavadas com solução fisiológica, fixadas com metanol e coradas por Hematoxilina e Eosina (HE). Posteriormente, foram montadas em uma lâmina e levadas para leitura em microscópio de luz.

2.7 Contagem das células. A contagem das células foi feita em microscópio de luz na objetiva de 100x. Cada lamínula foi dividida em 4 campos onde foram contadas 100 células por campo. Em cada lamínula foram somadas as quantidades de células X dos quatro campos e foi calculado a média e o desvio padrão para cada tipo celular.

2.8 Análise estatística. Média e desvio padrão de cada tipo celular em cada ponto experimental, para cada um dos tratamentos. Comparação de análise de variância para as médias de cada ponto experimental e teste de “t” para avaliar as diferenças nas cinéticas das migrações celulares.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras 1 e 2 apresentam-se os resultados da frequência da migração de neutrófilos, macrófagos e células gigantes no primeiro e no terceiro dia após a implantação das lamínulas. O neutrófilo foi o primeiro tipo celular a migrar para a lamínula em todos os grupos experimentais. No terceiro dia ocorreu uma inversão na migração e a célula que passou a migrar em maior quantidade para o corpo estranho foi o macrófago. Porém, já no primeiro dia após o implante, as lamínulas dos animais tratados topicamente com óleo mineral ou com óleo de *C. langsdorffii*, apresentaram uma diminuição significativa de neutrófilos e também uma migração precoce de mononucleares. Apesar de se tratar metodologias diferentes, os resultados obtidos, por PAIVA et al. (2004a), numa avaliação do efeito protetor do óleo da *C. langsdorffii* em colites provocadas por ácido acético, a administração do óleo extraído da planta também foi capaz de reduzir os sinais histológicos de inflamação, tais como a infiltração de neutrófilos, edema e a injúria tecidual 24 horas após a indução da inflamação. Os autores atribuíram estes resultados, pelo menos em parte, às atividades antioxidantes e anti-lipoperoxidases do óleo.

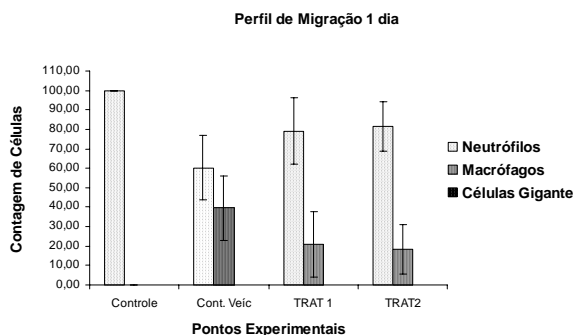


FIGURA 1: Perfil de migração celular do 1º ponto experimental (P1), em camundongos submetidos a implante de lamínula e tratados com *C. langsdorffii*. Goiânia, Junho, 2006.

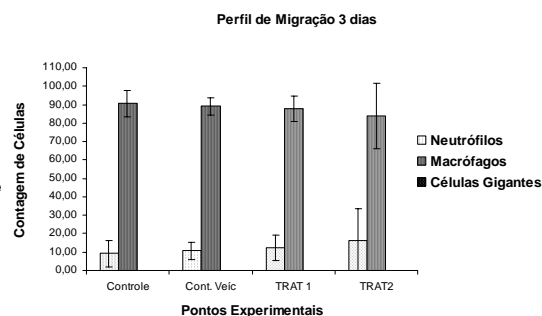


FIGURA 2: Perfil de migração celular do 3º ponto experimental (P3), em camundongos submetidos a implante de lamínula e tratados com *C. langsdorffii*. Goiânia, Junho, 2006.

A Figura 3 mostra que a partir do quinto dia após o implante da lamínula, em todos os grupos experimentais, os macrófagos começam a formar células gigantes multinucleadas de corpo estranho. Esse fenômeno, inicialmente, envolve poucos macrófagos e a quantidade de núcleos em cada célula é pequena, porém à medida que o tempo avança, a célula gigante pode possuir até mais de 30 núcleos (dados não mostrados). Estes resultados corroboram com BIRNAN & MARIANO et al. (1985), e MARIANO et al. (1995) que descreveram detalhadamente como ocorre o processo de migração celular para lamínula frente a diferentes agentes inflamatórios.

Cinética de migração celular de células gigantes nos diferentes tipos de tratamento de 1 a 14 dias

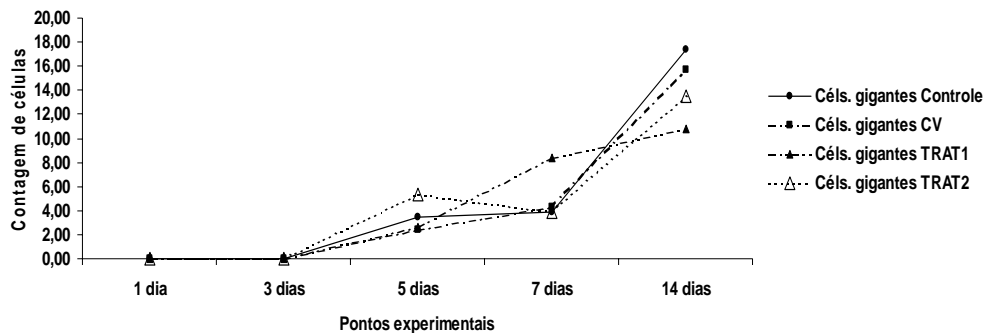


FIGURA 3: Cinética de migração de células gigantes do 1º ao 14º dia após o implante da laminula em camundongos submetidos a diferentes tipos de tratamentos. Controle (sem tratamento tópico), CV (tratamento tópico com óleo mineral), TRAT1 (tratamento tópico com composto de óleo mineral + óleo de *C. langsdorffii*) e TRAT2 (tratamento tópico com óleo de *C. langsdorffii*) Goiânia, Junho, 2006.

Ao sétimo dia o aumento de células gigantes é significativo apenas no grupo em que o tratamento é uma combinação de óleo mineral (glicerina) e o óleo de *C. langsdorffii*. No 14º dia, apesar da frequência de células gigantes em todos os grupos experimentais continuarem aumentadas, os grupos tratados com o composto de óleo mineral e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e com o óleo de *C. langsdorffii* (T2) apresentaram suas frequências diminuídas ($p < 0,05$). Este resultado sugere que o tratamento com *C. langsdorffii* diminui a formação deste tipo celular. A diminuição de células gigantes é uma característica que pode indicar uma atividade antiinflamatória decorrente do uso dos tratamentos, esse efeito pode estar associado à presença de um diterpeno, ácido kaurenóico, pois este ácido inibe a atividade do fator de transcrição NF-kB, uma importante molécula envolvida no processo de ativação celular (CASTRILLO et al., 2001 e PAIVA et al., 2002). Essa hipótese de ação antiinflamatória associada por um efeito protetor por parte da *C. langsdorffii* foi reforçada quando PAIVA et al. (2004b), apresentaram a ação do óleo de *C. langsdorffii* em danos teciduais causados pela síndrome de isquemia e reperfusão do intestino de ratos.

Cinética de migração de neutrófilos nos diferentes tratamentos de 1 a 14 dias

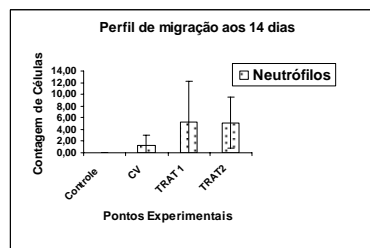
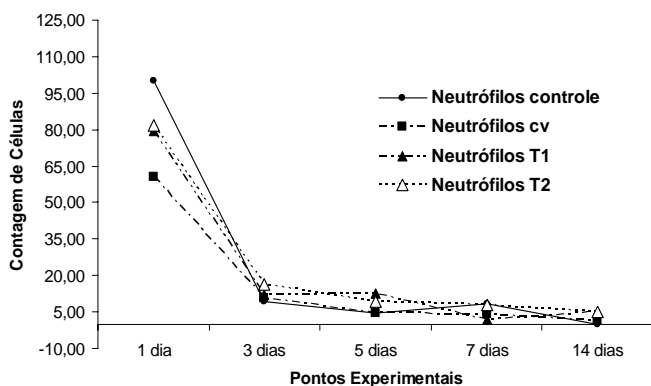


FIGURA 4: Cinética de migração de neutrófilos do 1º ao 14º dia após o implante da laminula em camundongos submetidos a diferentes tipos de tratamentos. Controle (sem tratamento tópico), CV (tratamento tópico com óleo mineral), TRAT1 (tratamento tópico com composto de óleo mineral + óleo de *C. langsdorffii*) e TRAT2 (tratamento tópico com óleo de *C. langsdorffii*). O quadro mostra a frequência de aparecimento de neutrófilos no 14º dia. Goiânia, Junho, 2006.

Paradoxalmente, outro evento interessante apresentado nesses resultados foi a variação do número de neutrófilos (FIGURA 4). Essas células que deveriam estar presentes apenas nos períodos iniciais, de 1 a 3 dias (MARIANO et al. (1995), estavam aumentadas nos grupos tratados no 14^o dia. Isso ocorreu de forma significativa nos grupos T1 e T2, evidenciando uma agudização do processo inflamatório.

4. Conclusão

Esses resultados demonstraram que a cinética de migração celular é influenciada pela presença de tratamentos cutâneos. Os tratamentos estabelecidos foram capazes de provocar uma variação tanto na frequência de aparecimento dos diferentes tipos celulares quanto na cronologia dos eventos inflamatórios. O óleo de *C. langsdorffii* induziu diminuição no número de neutrófilos 24 após o implante da lamínula. Além disso, provocou a diminuição do número de células gigantes multinucleadas que migraram para as lamínulas implantadas em camundongos submetidos a tratamento tópico durante quatorze dias, porém causou, também, aumento de neutrófilos nesse período, sugerindo um efeito antiinflamatório ambíguo.

5. Referências Bibliográficas

1. BASILE, A. C.; SERTIE, J. A. A.; FREITAS, P. C. D.; ZANINI A. C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 101-109, 1988.
2. BIGHETTI, E. J. B.; HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO J. S.; SOUZA BRITO, A. R. M. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 1447-1453, 1999.
3. BIRMAN, E. G.; MARIANO, M. The influence of inflammatory agents on giant cell formation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 18, p. 507-512, 1985.
4. CASTRILLO, A.; HERAS, B.; HORTELANO, S.; RODRIGUEZ, B.; VILLAR, A.; BOSCA, L. Inhibition of the Nuclear Factor kB (NF-kB) Pathway by Tetracyclic Kaurene Diterpenes in Macrophages. **The journal of Biological Chemistry**, v. 276 (19), p. 15854-15800, 2001.
5. FREIRE, S. M. F. **Atividades analgésica, antiinflamatória e cardiovascular da *Scoparia dulcis* L. (vassourinha)**. Estudos químicos e farmacológicos. 1992. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
6. MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
7. MARIANO, M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, p. 161-176, 1995.
8. PAIVA, L. A. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascul Pharmacol**, v. 39 (6), p. 303-307, 2002.
9. PAIVA, L.A.F.; GURGEL, E.T.S.; SILVEIRA, E.R.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleon-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 93, p.51-56, 2004a.
10. PAIVA, L.A.F.; GURGEL, E.T.S.; CAMPOS, A.R.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sciences**, v. 75, p. 1979–1987, 2004b.
11. SALVADOR, V. **História do Brasil: 1500-1627**, 6^a. ed., Melhoramentos: São Paulo, p. 65, 1975.