

EFEITOS DO BETA-MIRCENO SOBRE O COMPORTAMENTO DE LEUCÓCITOS

Cristina Beatriz Buzelli Noronha (PICBIC), Profa. Dra. Francielli Maria de Souza Silva Comar (Co-orientador), Prof. Dr. Jurandir F Comar (Orientador), e-mail: cristinabbn1@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Maringá, PR.

Área e subárea do CNPq/CAPES: Farmacologia.

Palavras-chave: β -mirceno; quimiotaxia; fagocitose.

Resumo

O composto β -mirceno (MIR) é um hidrocarboneto, da classe dos monoterpenos, presente nos óleos essenciais de plantas, como de capim limão, alecrim e na *Cannabis* spp. Este composto possui um perfil aromático almiscarado e terroso e desempenha excelentes atividades terapêuticas, tais como ação antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, dentre outras. Neste estudo, foram avaliadas as atividades do MIR sobre a quimiotaxia e fagocitose de leucócitos. Os resultados obtidos demonstraram que o MIR na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de promover uma redução na quimiotaxia dos leucócitos, em resposta ao estímulo do fMPL. MIR em todas as concentrações testadas promoveu uma diminuição significativa na atividade fagocítica. Dessa forma, o presente trabalho conclui que o MIR apresenta atividade anti-inflamatória, sendo capaz de reduzir a migração e a fagocitose de leucócitos.

Introdução

O processo inflamatório é uma resposta natural do organismo frente a um agente que possa acarretar danos, injúria ou até mesmo lesões teciduais (Etienne, 2021). Essa resposta é caracterizada por alterações do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular e do recrutamento leucocitário, processos estes que decorrem da liberação de mediadores pró-inflamatórios (Tracy, 2006).

O recrutamento ou migração de leucócitos para o foco da injúria é uma etapa importante da resposta inflamatória, uma vez que estes atuam como células de primeira linha de defesa, desde a fase inicial até a resolução do processo. 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. Embora neutrófilos desempenhem papel essencial na resposta inflamatória, sua migração e resposta desregulada desencadeiam danos teciduais (Almeida, 2016).

O β -mirceno (MIR) é um monoterpeno de aroma agradável, presente em óleos

essenciais de muitas plantas como, erva-cidreira, capim-limão, louro, verbena, lúpulo entre outros; sendo o principal componente do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). É um importante composto usado na fabricação de cosméticos e aromatizante utilizado na indústria alimentícia (Maggi et al., 2011). O β -mirceno apresenta diversas ações farmacológicas importantes, como efeito analgésico, sedativo, neuroprotetor, atividade antimicrobiana, antiulcerogênica, antioxidante (Bonamim et al., 2014). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade do composto isolado MIR na quimiotaxia e fagocitose de leucócitos.

Materiais e métodos

Foram utilizados camundongos Balb-c, pesando de 20-25g. Para o ensaio de quimiotaxia *in vitro*, a peritonite foi induzida por meio de uma injeção intraperitoneal de zymosan (1mg/animal). Após 4h, os camundongos foram eutanasiados com overdose de cetamina/xilazina (300 e 30 mg/kg), e em seguida foi realizada lavagem da cavidade peritoneal com solução tampão (PBS, pH 7,4). O exsudato peritoneal foi coletado, centrifugado e ajustado o número de leucócitos para 1×10^6 células/mL em meio RPMI 1640. Em seguida, as células foram incubadas com MIR 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 foi incubado sem o MIR. Após a incubação, foram adicionados ao compartimento inferior da câmara de Boyden o quimioatraente fMLP (10^{-6} M) e o controle negativo (meio RPMI 1640). Uma membrana de polycarbonato 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. A suspensão de leucócitos para os controles e as suspensões de leucócitos pré-tratadas com β -mirceno foram pipetadas no compartimento superior da câmara. Após incubação, a membrana foi retirada, lavada e corada utilizando InstantProv (Newprove®). Os leucócitos que migraram pela membrana foram contados utilizando microscopia óptica (1000x).

No ensaio de fagocitose, a suspensão de células obtida após a centrifugação foi incubada nas concentrações 3, 10, 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$ por 30 minutos. Para indução da fagocitose, foram utilizadas partículas de zymosan previamente opsonizadas. As células tratadas foram então incubadas com a solução de zymosan previamente opsonizado por 30 minutos, a 37°C em 5% CO_2 . Em seguida, foram preparadas lâminas e realizada a contagem em microscópio óptico e os resultados foram expressos em números de neutrófilos em fagocitose por 100 neutrófilos.

Resultados e Discussão

Para verificar o efeito direto do MIR sobre a quimiotaxia de leucócitos *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 leucócitos quando comparados ao grupo controle (RPMI 1640). O tratamento com MIR na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ reduziu (57%) significativamente o recrutamento de leucócitos quando comparado ao fMLP (Figura

1).

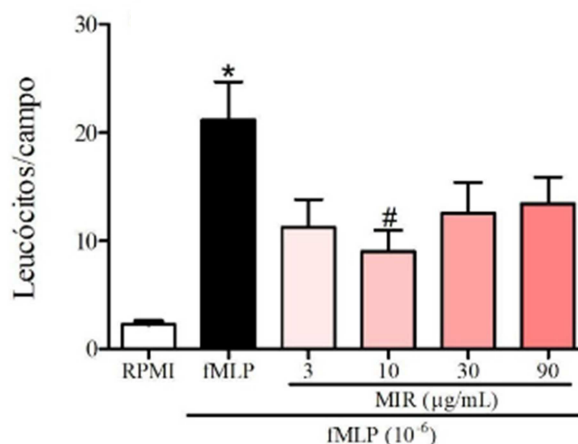


Figura 1. Efeito do β -mirceno (MIR) sobre a quimiotaxia de leucócitos. Os leucócitos obtidos da cavidade peritoneal dos camundongos foram tratados com o MIR nas concentrações de 3, 10, 30, 90 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando 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..

Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio inflamatório, sendo especialmente efetivos contra infecções bacterianas. Seu principal mecanismo para eliminação de patógenos é a fagocitose. Nossos resultados mostram que o MIR, nas concentrações 3, 10, 30, e 90 $\mu\text{g/mL}$, reduziu significativamente a habilidade fagocítica dos neutrófilos em 30,12%, 51,02%, 61,55% e 56,18%, respectivamente (Figura 2).

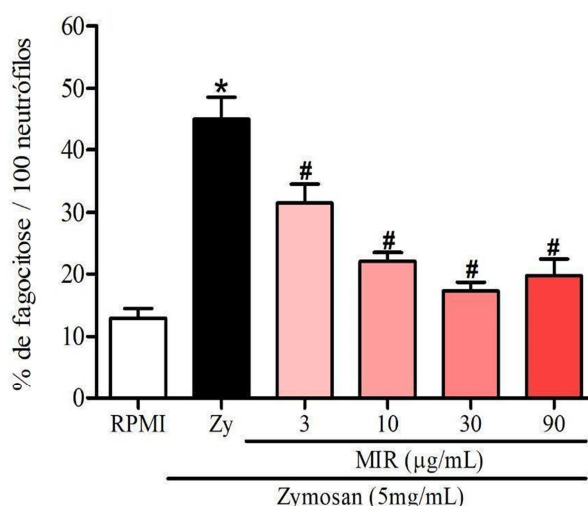


Figura 2. Efeito do MI, sobre a atividade fagocitária de neutrófilos. Os neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal dos camundongos foram tratados com o β -mirceno nas concentrações de 3, 10, 30, 90 $\mu\text{g/mL}$ e posteriormente incubados com partículas de zymosan previamente opsonizadas. Os resultados são representativos de 2 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.

Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o MIR diminuiu a quimiotaxia e fagocitose de leucócitos em diversas concentrações, o que comprova que esse composto possui atividade anti-inflamatória. Todavia, outros estudos ainda são necessários elucidar os mecanismos anti-inflamatórios deste composto.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo financiamento do meu projeto, ao Departamento de Farmacologia e Terapêutica (DFT) e seus membros, principalmente meu orientador, coorientador, pós-graduandos e técnicos do laboratório da inflamação, que tanto me ajudaram e possibilitaram o desenvolvimento de todo trabalho.

Referências

- ALMEIDA, O. P. **Patologia Oral**. Brasil, Artes Médicas, v. 1, p. 9-11, 2016
- CIFTCI, Osman; OZTANIR, M. Namik; CETIN, Asli. Neuroprotective effects of β -myrcene following global cerebral ischemia/reperfusion-mediated oxidative and neuronal damage in a C57BL/J6 mouse. **Neurochemical research**, v. 39, p. 1717-1723, 2014.
- BONANIM, F., MORAES, T.M., SANTOS, R.C., KUSHIMA, H., FARIA, F.M., SILVA, M.A., JUNIOR, I.V., NOGUEIRA, L., BAUAB, T.M., BRITO, A.R.M.S., ROCHA, L.R.M., HIRUMA-LIMA, C.A. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. **Chem. Biol. Interac.** 212, 11–19, 2014.
- ETIENNE, Rachelle; VIEGAS, Flávia Pereira Dias; VIEGAS JR, Claudio. Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, 2021.
- MAGGI, M., GENDE, L., RUSSO, K., FRITZ, R., EGUARAS, M. Bioactivity of *Rosmarinus officinalis* essential oils against *Apis mellifera*, *Varroa destructor* and *Paenibacillus larvae* related to the drying treatment of the plant material. *Nat. Prod. Res.* 25(4), 397-406, 2011.
- TRACY, Russell P. The five cardinal signs of inflammation: calor, dolor, rubor, tumor... and penuria (apologies to Aulus Cornelius Celsus, *De medicina*, c. AD 25). **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 61, n. 10, p. 1051-1052, 2006.