

## EFEITOS DO GAMA-TERPINENO SOBRE O COMPORTAMENTO DE LEUCOCITOS

Rafaela Mariana Moraes de Carvalho (PIBIC/FA), Profa. Dra. Francieli Maria de Souza Silva Comar (co-orientadora), Prof. Dr. Roberto Cuman (Orientador). E-mail: ra109718@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Maringá, PR.

**Área e subárea:** Farmacologia

**Palavras-chave:** Farmacologia. Inflamação. Quimiotaxia.

### RESUMO

O  $\gamma$ -terpineno (GT) é um monoterpeneo presente no óleo essencial de diferentes plantas, como *Sarnareja thymbra* e *Coriandrum sativum*. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do GT no comportamento de leucócitos. Especificamente foram avaliados os efeitos do GT sobre a quimiotaxia *in vitro*, fagocitose de leucócitos e a microcirculação *in situ*. Os resultados mostraram que o GT, nas concentrações de 30  $\mu\text{g/mL}$  e 90  $\mu\text{g/mL}$ , reduziu significativamente a quimiotaxia *in vitro* e a atividade fagocítica dos neutrófilos. Além disso, GT (nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg) mostrou-se eficaz em reduzir o número de leucócitos *rolling* e aderidos, avaliados por meio da microscopia intravital. Com base nos resultados encontrados, pode-se concluir que o GT apresenta atividade anti-inflamatória, sendo assim um promissor composto que pode ser utilizado no tratamento das doenças inflamatórias agudas.

### INTRODUÇÃO

O recrutamento de leucócitos para o foco da injúria é a primeira linha de defesa, participando desde a fase inicial até a resolução do processo inflamatório. Inicialmente, os leucócitos circulantes rolam lentamente sobre o endotélio vascular, aderindo transitoriamente às moléculas de adesão presentes na membrana das células e na superfície dos próprios leucócitos. Dentre as moléculas de adesão, destacam-se as pertencentes à família das selectinas (E e P-selectinas nas células endoteliais e L-selectinas nos leucócitos) e seus respectivos ligantes (carboidratos). Após estes processos adesivos, os leucócitos migram (diapedese) pelas fendas entre as células do endotélio e se dirigem ao foco de lesão, um processo conhecido como quimiotaxia (Souto et al., 2011; Muller, 2009)

O monoterpeneo  $\gamma$ -terpineno (GT) está presente no óleo essencial de diferentes plantas, como *Sarnareja thymbra* e *Coriandrum sativum*. Estudos já demonstraram que este composto possui atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (Giweli et al., 2012, Hanafi et al., 2014). Apesar de haver poucos dados na literatura sobre o GT, há evidências de sua ação sobre a resposta inflamatória aguda. Sendo

assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do GT no comportamento de leucócitos. Especificamente foram avaliados os efeitos do GT sobre a quimiotaxia *in vitro*, fagocitose de leucócitos e a microcirculação *in situ*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para os experimentos foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c com peso corporal entre 20-25g, e ratos Wistar (180 – 220 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá.

Os efeitos do gama-terpineno sobre o processo de quimiotaxia *in vitro* foram observados em Câmara de Boyden. Resumidamente, serão adicionados ao compartimento inferior da câmara de Boyden, o quimioatraente fMLP ( $10^{-6}$  M) e o controle negativo (meio RPMI 1640). As suspensões de leucócitos ( $1 \times 10^6$  células/ml) pré-tratadas ou não com gama-terpineno foram colocadas no compartimento superior. A câmara foi então, incubada a 37°C por 90 minutos. Em seguida, a membrana que separa os dois compartimentos foi retirada, lavada e corada utilizando Instant Prov (Newprove®). Os leucócitos que migraram na membrana serão contados utilizando microscopia óptica (100x).

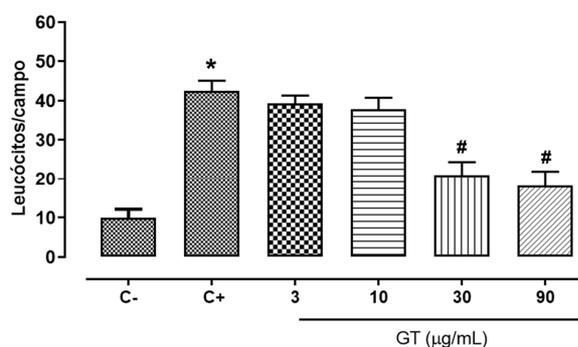
No ensaio de fagocitose, um mL dessa suspensão ( $2 \times 10^6$  leucócitos/mL) de células foi incubado com diferentes concentrações de GT por 30 min. Após o tempo de tratamento, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de meio RPMI contendo 10% de plasma de camundongo e 10 µl da solução de Zymosan opsonizado (5mg/mL), por 30 minutos, a 37 °C em 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram preparadas lâminas com essa suspensão final de células, que serão fixadas e coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A contagem será realizada em microscópio óptico e os resultados serão expressos em números de neutrófilos em fagocitose por 100 neutrófilos.

Os processos de rolamento (*rolling*) e adesão endotelial de leucócitos foram utilizados como parâmetros para avaliar a migração de leucócitos. Estes parâmetros foram avaliados *in situ*, pelo método de microscopia intravital, na fâscia espermática interna de ratos Wistar. O número de leucócitos *rolling* e aderidos foram contados por 10 minutos em duas vênulas.

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.

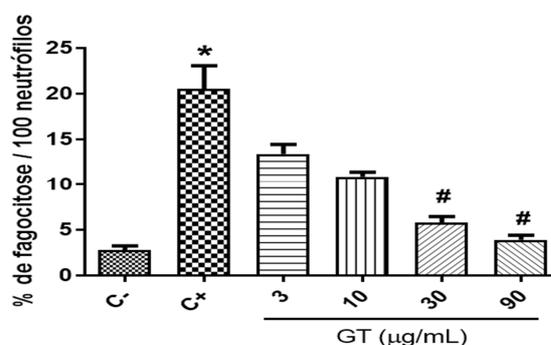
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o fMLP estimulou significativamente a migração de leucócitos. GT nas concentrações de 30 µg/mL e 90 µg/mL promoveu uma diminuição significativa na quimiotaxia de leucócitos quando comparado ao fMLP (agente quimiotático) (Figura 1).



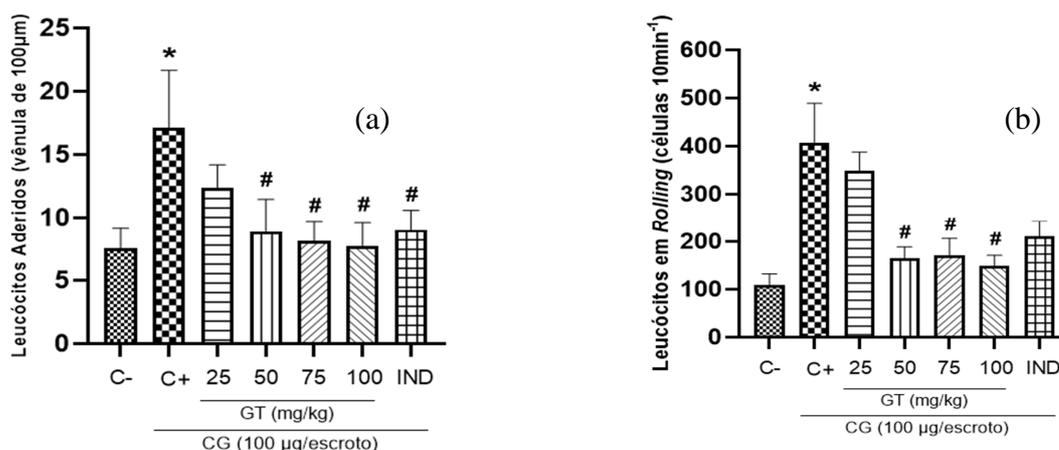
**Figura 1.** Efeito do  $\gamma$ -terpineno (GT) sobre a quimiotaxia de leucócitos. Os leucócitos obtidos da cavidade peritoneal dos camundongos foram tratados com GT nas concentrações de 3, 10, 30, 90  $\mu\text{g/ml}$ . \* $p < 0,05$  quando comparado ao RPMI (controle negativo). # $p < 0,05$  quando comparado ao fMLP (controle positivo). Os dados foram analisados usando o teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Resultados semelhantes foram encontrados no experimento da fagocitose de neutrófilos. Os neutrófilos são as primeiras células a alcançar o local da inflamação, onde auxiliam na eliminação de microorganismos através de fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e liberação de substâncias microbicidas (Souto et al., 2011). O GT nas concentrações de 30 e 90  $\mu\text{g/mL}$  foi capaz de reduzir a atividade fagocítica de neutrófilos (Figura 2).



**Figura 2.** Efeito do  $\gamma$ -terpineno (GT), sobre a atividade fagocitária de neutrófilos. Os neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal dos camundongos foram tratados com o GT nas concentrações de 3, 10, 30, 90  $\mu\text{g/ml}$  e posteriormente incubados com partículas de zymosan previamente opsonizadas. \* $p < 0,05$  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.

Os processos de rolamento e adesão de leucócitos foram observados por meio da microscopia intravital. O pré-tratamento dos animais com GT, nas doses de 50, 75 e 100  $\text{mg/kg}$  reduziu significativamente o número de leucócitos aderidos (48,3%, 47,5% e 55,3% respectivamente) (Figura 3a) e de leucócitos *rolling* (59,6%, 58% e 63,6% respectivamente) (Figura 3b).



**Figura 3.** Efeito do  $\gamma$ -terpineno (GT) sobre rolamento de leucócitos (a) e na adesão (b) induzida por carragenina. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM. \*P < 0,05 versus solução salina. #P < 0,05 versus grupo controle.

## CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo demonstram que o GT tem potencial anti-inflamatório devido a sua capacidade de reduzir a migração e a atividade fagocitária dos neutrófilos.

## AGRADECIMENTOS

A Fundação Araucária pela bolsa de fomento científico.

## REFERÊNCIAS

GIWELL, A.; DŽAMIC, AM.; SOKOVIĆ, M.; RISTIC, MS.; MARIN, PD. Animal and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbre* growing wild in Libya. **Molecules**, 17 (5) 4836-50, 2012.

HANAFI, R.S.; SOBEH, M.; ASHOUR, M.L.; EL-READL M.Z.; DESOUKE, S.; RAIMUND, N.; ABADI A.H.; WINK, M. **Nat Prod J**, 4(1): 63-49, 2014.

MULLER, W.A. Mechanisms of Transendothelial Migration of Leukocytes. **Circ Res.**, 105: 223-230, 2009

SOUTO, F. O.; ZARPELONA, C.; STAURENGO-FERRARI, L.; CASAGRANDE, R.; FONSECA, M. J. V.; CUNHA, T. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W. A. Quercetin Reduces Neutrophil Recruitment Induced by CXCLs, LTB<sub>4</sub>, and fMLP: Inhibition. of Actin Polymerization. **Journal of Natural Products**. 74: 113-118, 2011