



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUIS ALEX DE CARVALHO WANDERLEY

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO CITRONELAL SOBRE
FUNÇÕES DE LINFÓCITOS MURINOS**

Maceió – AL

2017

LUIS ALEX DE CARVALHO WANDERLEY

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO CITRONELAL SOBRE
FUNÇÕES DE LINFÓCITOS MURINOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Salete Smariotto.

Maceió – AL

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

W245a Wanderley, Luis Alex de Carvalho.

Avaliação da atividade anti-inflamatória do citrôn timer sobre as funções de linfócitos murinos / Luis Alex de Carvalho Wanderley. – 2017.

65 f. ; il.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.

Coorientadora: Saete Smaniotto.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 56-64.

Anexo: f. 65.

1. Citrôn timer. 2. Migração. 3. Moléculas de adesão. 4. Citoesqueleto. 5. Citometria de fluxo. I. Título.

CDU: 616-097:615.276



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Luis Alex de Carvalho Wanderley

Avaliação da atividade anti-inflamatória do citrônial sobre funções de linfócitos murinos

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 07 de abril de 2017.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto (Orientador)

Prof. Dr. Renato Santos Rodarte - (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Klayza Moreira Ramos - (CESMAC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Divina Sabedoria, a grande mente divina, ao caminho de Cristo. Ao entendimento da causa e efeito. Buddha. À evolução!

À família, retiro de paz e tranquilidade. Clarice, Missi, Mãe e Pai. Tio José e Tia Sônia. À minha avó, que hoje repousa com Deus.

Aos amigos de vida e de estudos, Marvin Paulo, Fagner, Návylla, Jamile Taniele, Kivia Queiroz, Clarice Agudo, Janylle Nunes, Fabiane Moura e outras pessoas de muito valor! Todos que ensinam e aprendem. Amigos “Vida Loka”, Arely, Max, Mel, Rapha, Almir, Eric, Emersom, Felipe, Edinir. Às Grandes mentalidades, que ousaram ultrapassar barreiras, tabus e limites do pensamento: Einstein, Aristóteles, Darwin, Tesla, Erich von Daniken, Da Vinci, Martinho Lutero. Madame Bovary, Marie Curie. Mahatma Gandhi, Muhammad Ali. John Lennon. Freud, Jung.

Ao meu orientador, Emiliano Barreto, bem como aos demais bons professores, que engendram sua vida neste ofício que é dos mais nobres.

À internet, À Google, sua equipe e idealizadores, e aos russos, especialmente da iniciativa Sci-hub, e a todos que lutam pela democratização da informação e contra a ignorância e segregação.

A Raul Seixas. A Chico Buarque, Belchior, Zé Ramalho, Glue Trip, Denise Assunção. Pink Floyd, Banco dei Mutuo Soccorso.

Ainda, aos Arturianos e Telosianos, os que mantem interações positivas, a tudo o que se empenha em prol da harmonia.

RESUMO

Inflamação é um processo fisiológico que tem o objetivo de proteger o organismo contra infecções e injúrias. No entanto, inúmeras condições levam à inflamação patológica, e este desequilíbrio precisa então ser tratado terapêuticamente. Plantas naturais são usadas há milênios para o tratamento das doenças, e a ciência moderna permitiu o isolamento e identificação de compostos ativos. O citronelal é uma substância fitoterápica com eficácia demonstrada no tratamento da inflamação, entre outros efeitos, mas pouco se sabe sobre a sua atuação em células do sistema imunológico. Por isso, neste trabalho buscou-se avaliar o potencial anti-inflamatório do citronelal sobre linfócitos, importantes células que regem o processo inflamatório. Para tal, linfócitos murinos foram obtidos de linfonodos subcutâneos (autorização CEP N° 028370/2010-07) e expostos ao citronelal por 1 hora antes de cada ensaio. Avaliou-se a interferência do tratamento do citronelal em linfócitos sobre a migração, adesão, expressão de moléculas de adesão e frações dos filamentos de actina. Neste estudo, o citronelal reduziu a capacidade migratória de linfócitos, tanto espontânea quanto orientada (quimiotaxia induzida por CXCL12) independente da subpopulação de linfócitos (T-CD4⁺, T-CD8⁺ e B220⁺). Em outro ensaio, observou-se que o tratamento com citronelal aumentou a adesão dos linfócitos totais, com aumento destacado de linfócitos B220⁺. Ao se avaliar duas importantes moléculas de adesão que participam no recrutamento, VLA-4 e CD62L, o tratamento com citronelal foi capaz de reduzir o número de linfócitos VLA-4⁺, no entanto sem alterar a expressão média deste receptor de superfície, e nenhuma alteração foi observada quanto ao CD62L. Como a migração, adesão e as integrinas estão relacionadas com o citoesqueleto celular para seu funcionamento, a avaliação da actina filamentosa (F-actina) é extremamente relevante e foi demonstrado que o citronelal aumentou os níveis de F-actina em linfócitos, principalmente nos tipos CD4⁺ e CD8⁺. Dessa forma, o conjunto dos resultados indicam que o citronelal exerce efeito na mobilização de linfócitos, com notável modulação do citoesqueleto de F-actina.

Palavras-chave: Citronelal. Linfócitos - Migração. Moléculas de adesão.

Citometria de Fluxo. Citoesqueleto.

ABSTRACT

Inflammation is a physiological process that aims to protect the body from infection and injury. However, numerous conditions lead to pathological inflammation, and this imbalance needs to be treated therapeutically. Natural plants have been used for millennia for diseases treatment, and modern science has allowed the isolation and identification of active compounds. Citronellal is an herbal substance with proven efficacy in the treatment of inflammation, among other effects, but little is known about its performance in cells of the immune system. Therefore, in this work we sought to evaluate the anti-inflammatory potential of citronellal on lymphocytes, important cells that govern the inflammatory process. For this purpose, murine lymphocytes were obtained from subcutaneous lymph nodes (CEP authorization No. 028370 / 2010-07) and exposed to citronellal for 1 hour before each assay. The interference of citronellal treatment on lymphocytes over migration, adhesion, expression of adhesion molecules and fractions of actin filaments was evaluated. In this study, citronellal reduced the capacity of both spontaneous and targeted (CXCL12-induced chemotaxis) migration of lymphocytes, independent of the subpopulation of lymphocytes (T-CD4⁺, T-CD8⁺ and B220⁺). At another assay, citronellal treatment was shown to increase total lymphocyte adhesion, with a marked increase in B220 + lymphocytes. When evaluating two important adhesion molecules participating in the recruitment, VLA-4 and CD62L, treatment with citronellal was able to reduce the number of VLA-4⁺ lymphocytes, however without altering the mean expression of this surface receptor, and none alteration was observed for CD62L. As migration, adhesion and integrins are related to the cellular cytoskeleton for its functioning, the evaluation of filamentous actin (F-actin) is extremely relevant and it has been shown that citronellal increased the levels of F-actin in lymphocytes, mainly in the types CD4⁺ and CD8⁺ cells. Thus, all the results indicate that citronellal exerts an effect on the mobilization of lymphocytes, with remarkable modulation of the F-actin cytoskeleton.

Keywords: Citronellal. Lymphocytes - Migration. Molecules of adhesion.

Flow cytometry. Cytoskeleton.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Forma globular da actina é polimerizada na extremidade farpada para executar funções como a movimentação celular e de organelas.	19
Figura 2 – Estrutura molecular dos Enantiômeros “+” ou “R”, e enantiômero “-” ou “S” do citronelal.	23
Figura 3 – Estratégia de <i>gate</i> adotada para delimitação de células avaliadas quanto à presença de F-actina em relação às subpopulações.	29
Figura 4 – Viabilidade celular de linfócitos tratados por 1 hora com citronelal.	30
Figura 5 – Viabilidade celular de linfócitos tratados por 6 horas com citronelal.	31
Figura 6 – Viabilidade celular de linfócitos tratados por 24 horas com citronelal.	32
Figura 7 – Migração espontânea de linfócitos expostos ao citronelal.	33
Figura 8 – Imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos migrantes.	34
Figura 9 – Migração de linfócitos sob efeito do citronelal, induzida por CXCL12.	36
Figura 10 – Efeito do citronelal sobre a adesão de linfócitos totais.	37
Figura 11 – Imunofenotipagem dos linfócitos submetidos ao ensaio de adesão.	37
Figura 12 – Expressão média de VLA-4 nos linfócitos.	39
Figura 13 – Quantitativo de linfócitos positivos para VLA-4.	40
Figura 14 – Expressão média de CD62L nos linfócitos.	41
Figura 15 – Quantitativo de linfócitos positivos para CD62L.	42
Figura 16 – Efeito do citronelal sobre o conteúdo de F-actina em linfócitos.	43
Figura 17 – Efeito do citronelal sobre a distribuição de subpopulações de linfócitos com aumento de citoesqueleto.	43
Figura 18 – Conteúdo de actina filamentosa nas subpopulações de linfócitos expostos ao citronelal.	45
Figura 19 – Quantitativo de linfócitos totais ou nas subpopulações, com conteúdo aumentado de F-actina (F-actina ^{HIGH}) após exposição ao citronelal.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
BSA	Albumina bovina sérica
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> ou Grupamento de Diferenciação
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CXCL12	Quimiocina CXC <i>motif</i> ligante 12
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
EPM	Erro padrão da média
GPCR	Receptor de Proteína G acoplado à superfície
IL	Interleucina
MIF	MIF Média de intensidade de fluorescência
mL	Mililitro
PBS	Tampão salina fosfatado
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	Soro bovino fetal
SNC	Sistema nervoso central
TCR	Receptor de células T
Thelper	Linfócito T auxiliar
Treg	Linfócito T regulatório
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VLA	Antígeno Muito Tardio (Very Late Antigen)
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo geral.....	11
2.2	Objetivos específicos	11
3	REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1	Aspectos gerais da inflamação	12
3.2	Linfócitos.....	14
3.3	Papel do linfócito na inflamação	16
3.4	Terpenos e produtos de plantas para fins terapêuticos	20
3.5	Citronelal.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	Reagentes	25
4.2	Obtenção de células e tratamento	25
4.3	Ensaio de viabilidade celular por MTT	26
4.4	Ensaio de migração celular.....	26
4.5	Avaliação de adesão celular	27
4.6	Identificação e análise das subpopulações de linfócitos por citofluorometria ...	27
4.7	Análise da expressão de F-actina por citofluorometria	28
4.8	Análise estatística	29
5	RESULTADOS	30
5.1	Efeito do citronelal sobre a viabilidade de linfócitos.....	30
5.2	Efeito do citronelal sobre a migração de linfócitos	32
5.3	Avaliação da adesão de linfócitos sob efeito de citronelal	36
5.4	Efeito do citronelal sobre moléculas de adesão linfocitárias	39
5.5	Actina filamentosa.....	42
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta complexa do organismo mediante uma determinada injúria. Esta resposta é caracterizada por eventos vasculares, celulares e moleculares com a finalidade de eliminar o agente lesivo e o promover reparo tecidual e reestabelecer a homeostase do organismo (SCHETT, 2008; KVIETYS; GRANGER, 2012).

Apesar de ter uma função benéfica para o organismo, a inflamação pode ultrapassar os limites fisiológicos e induzir danos ao organismo, propiciando o estabelecimento de patologias. Relatórios da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2015) indicam que em 2012 as doenças inflamatórias, como a doença pulmonar obstrutiva crônica e a asma, foram a terceira causa de morte no mundo, responsáveis por cerca de 3,46 milhões de óbitos (MARMITT et al., 2015). Para o tratamento destas condições, utiliza-se medicamentos das classes dos anti-inflamatórios não-esteroides (AINES), glicocorticoides e, em algumas situações como na artrite, imunossupressores. No entanto, a terapêutica medicamentosa disponível apresenta efeitos adversos que levam a um sucesso limitado no tratamento, suscitando a necessidade da descoberta de novos fármacos capazes de tratar desordens inflamatórias com menos efeitos indesejáveis e maior segurança terapêutica (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006; DINARELLO; SIMON; MEER, 2012; AN et al., 2013; MARMITT et al., 2015).

A Divisão de Medicina Tradicional da OMS reconhece que o uso secular de plantas medicinais na terapêutica deve ser levado em consideração como prova de sua eficácia (CALIXTO, 2000; COAN; MATIAS, 2014; STOLZ et al., 2014). Além disso, a biodiversidade brasileira é conhecida como uma abundante fonte de compostos biologicamente ativos, considerado por cientistas entusiastas como um “Eldorado verde”. Porém, a carência de conhecimento sobre composição química, distribuição e variabilidade das espécies vegetais, além de iniciativas para triagem de grande número de amostras, representam uma dificuldade nas pesquisas por novos fármacos anti-inflamatórios, desperdiçando um valioso potencial terapêutico (CALIXTO, 2000; RATES et al., 2001; COAN; MATIAS, 2014; MARMITT et al., 2015; SKIRY CZ et al., 2016).

Plantas medicinais produzem metabólitos secundários em resposta a diversos estímulos, e estes compostos atuam, geralmente, para proteger as plantas diante de

situações como fungos, parasitismo e clima adverso. Entre estes metabólitos, estão os alcaloides, flavonoides e terpenóides (PATRA et al., 2013). Os terpenos são uma das maiores classes de compostos naturais presentes em diversas espécies animais e vegetais, e possuem diferentes efeitos biológicos já caracterizados, como cicatrizantes, antioxidantes, anticarcinogênicos, antinociceptivo, antiedematogênicos e anti-inflamatórios (GUIMARAES et al., 2014; YERUVA et al., 2007; DEB et al., 2011; MAßBERG et al., 2015; SANTANA et al., 2015; AGRA et al., 2016).

Dentre os compostos da classe dos terpenos destaca-se o citronelal, um monoterpeno encontrado em diversas plantas como a *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus*, *Corymbia citriodora*, *Eucalyptus citriodora*, sendo ainda encontrado em quantidades variáveis em óleos essenciais de mais de 50 espécies, isolado por métodos como destilação a vapor e extração por solventes (KOBAYASHI et al., 2009; MELO et al., 2010; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010; MULYANINGSIH et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011b; ALTSHULER et al., 2013; WEI; WEE, 2013).

Óleos essenciais ricos em citronelal apresentaram efeito antibacteriano, hipotensor e vasorrelaxante, atua como depressor do Sistema Nervoso Central (SNC), possuem efeito anticonvulsivante, e ainda antinociceptivo e anti-inflamatório (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008; SILVA et al., 2010; WEI; WEE, 2013). Estudos prévios com animais mostraram que o citronelal apresentou efeitos anticonvulsivante e antinociceptivo sem afetar seu desempenho motor (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008; MELO et al., 2010; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010). Além disso, a ação anti-inflamatória do citronelal foi demonstrada por inibir a formação do edema e migração de leucócitos estimulados por carragenina, capsaicina, formalina, glutamato e ácido araquidônico (MELO et al., 2011a; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011).

No entanto, apesar dos dados disponíveis até o momento, não há estudos que avaliem os efeitos do citronelal sobre células importantes da resposta inflamatória. A ativação de linfócitos é um passo fundamental, e necessário ao desenvolvimento de diversos eventos na resposta inflamatória, que dependem de processos celulares e liberação de diferentes mediadores. Não obstante, até a presente data não há nenhum estudo que avalie o efeito do citronelal diretamente sobre este tipo de leucócito. Portanto, considerando a ausência de dados na literatura quanto às ações do citronelal sobre esta importante célula, este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do citronelal sobre as funções de linfócitos em modelos experimentais *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do citronelal sobre funções de linfócitos murinos.

2.2 Objetivos específicos

De forma específica objetiva-se avaliar os efeitos in vitro do citronelal sobre:

- A viabilidade de linfócitos.
- A capacidade migratória de linfócitos.
- A adesão inespecífica de linfócitos.
- A dinâmica dos filamentos de actina em linfócitos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais da inflamação

Inflamação é um processo fisiológico caracterizado por inchaço, vermelhidão e febre, representados pelos sinais clássicos da inflamação - edema, rubor, dor e calor (HOTAMISLIGIL, 2006; LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006; MARMITT et al., 2015). Esta condição é descrita como a principal resposta do organismo a diferentes injúrias, causando recrutamento de leucócitos da corrente sanguínea para um órgão ou tecido que foi submetido a um estímulo traumático, infeccioso ou autoimune (SIMON; GREEN, 2005; KVIETYS; GRANGER, 2012; MARMITT et al., 2015).

Inúmeras doenças estão relacionadas direta ou indiretamente com a inflamação, como artrite, diabetes, câncer, colite, dermatites, psoríase e doenças autoimunes (KVIETYS; GRANGER, 2012; MARMITT et al., 2015).

A inflamação ocorre, geralmente, após uma lesão tecidual, e é seguida de eventos vasculares, em que ocorre uma vasoconstrição transitória, seguida de significativa vasodilatação que acarreta aumento do fluxo sanguíneo, promovendo assim o rubor, calor e, indiretamente, a formação do edema mediante contração da célula endotelial e enfraquecimento de junções entre estas células (HOTAMISLIGIL, 2006; SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008).

Eventos celulares também ocorrem no processo inflamatório. Há o recrutamento leucocitário, necessário para a defesa do hospedeiro contra infecções e para a cicatrização normal (HOTAMISLIGIL, 2006). Neutrófilos, macrófagos e monócitos infiltrados desempenham papel majoritário no combate a bactérias e outros patógenos, seja realizando a fagocitose, produzindo e/ou liberando espécies reativas e outros mediadores pré-formados, fragmentando e apresentando antígenos ou removendo debris (restos celulares) (GORDON, 2016).

Mastócitos liberam mediadores e enzimas como histamina e triptases, e atuam no controle da permeabilidade vascular e remodelamento tecidual. Linfócitos T ativam outras células e também atuam no remodelamento tecidual, secretando interleucinas; e um tipo específico de linfócito T, chamado " $\gamma\delta$ ", atua na proliferação, diferenciação de queratinócitos e síntese da molécula de matriz hialuronano (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; DINARELLO; SIMON; MEER, 2012).

Mediadores inflamatórios são estimulantes para a reação inflamatória. Existem mediadores exógenos (fatores de baixo peso molecular oriundos de patógenos) e endógenos (decorrentes de injúria celular). Dentre os tipos de mediadores pode-se citar citocinas, lipídeos, proteínas estruturais, enzimas e radicais livres (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008; MARMITT et al., 2015).

Por exemplo, tromboxano e leucotrienos participam em eventos vasculares, assim com as prostaglandinas, de modo antagônico. Lipopolissacarídeos oriundos de parede celular bacteriana estimulam células fagocíticas e outras células imunológicas a iniciar o processo inflamatório. Estes e outros, como componentes de complemento, mediadores, podem persistir, levando à inflamação crônica, ou o organismo pode se direcionar para a resolução, com a participação de resolvinas, protectinas e lipoxinas (FENNELL et al., 2004; SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008; MARMITT et al., 2015).

Enzimas importantes atuam nesta reação, e a principal que atua gerando os efeitos da inflamação é a cicloxigenase-2. Enquanto a cicloxigenase-1 é uma enzima produzida em diversos órgãos e tipos celulares, atuando em processos fisiológicos variados, a cicloxigenase-2 atua induzindo a inflamação, principalmente pela síntese de produtos pró-inflamatórios como prostaglandinas, a partir do ácido araquidônico. Enzimas também importantes são as lipoxigenases, que geram leucotrienos e lipoxinas (AN et al., 2013).

Os radicais livres também se mostram como importantes fatores alterados na inflamação. Ocorre um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico, que tem influência mais direta no desenvolvimento das alterações microvasculares observadas na inflamação. Quando intracelular, as EROs podem ainda levar à secreção de mediadores pró-inflamatórios (HENSLEY et al., 2000; KVIETYS; GRANGER, 2012).

Citocinas estão entre os mediadores da inflamação, onde há citocinas pró-inflamatórias que atuam nos eventos celulares e vasculares, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) e interleucinas, como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18. Além destes, citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 exercem papel importante na resolução do processo inflamatório (WONG et al., 2001; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

Nas células inflamatórias, receptores transmembranares de quimiotaxia acoplados à proteína G (GPCR) detectam moléculas ricas em cisteína chamadas quimiocinas. Entre os mediadores que atuam via GPCRs estão selectinas, integrinas,

caderinas, mucinas e superfamília de imunoglobulinas (SIMON; GREEN, 2005; SOLER et al., 2009; MITROULIS et al., 2015).

As células também são influenciadas por fatores quimiocinéticos, que atuam no processo de migração atraindo ou repelindo as células de um local mediante um gradiente de concentração. Quimiocinas são moléculas positivamente carregadas que estimulam a célula através de GPCR, levando a uma mudança conformacional (ativação) de receptores de superfície celular como as integrinas (BACHELERIE, 2010; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; PRESA et al., 2016).

3.2 Linfócitos

Os linfócitos constituem cerca de 20 a 30% dos leucócitos circulantes, e um terço dos linfócitos possuem sobrevivência de até vinte dias, enquanto outros vivem centenas de dias ou até muitos anos. Possuem diâmetro médio de 5,7 a 8 μm , com taxa núcleo/diâmetro celular de aproximadamente 0,8, representando uma célula relativamente pequena em comparação a outros leucócitos e com pouco conteúdo citoplasmático. É uma célula com forma nuclear arredondada ou elíptica (STROKOTOV et al., 2009).

Ainda na medula óssea, os linfócitos são ativados por fatores que os estimulam à diferenciação em linfócitos B ou linfócitos T a partir de células progenitoras multipotentes, tornando-se progenitores linfoides; as células seguem se diferenciando, ainda, em pró-linfócito B, pré-linfócito B, e célula B imatura, ocorrendo o rearranjo genético de imunoglobulinas pela ativação de enzimas recombinantes e regulado por fatores de transcrição e citocinas. Até os anos 2000, pensava-se que a medula óssea era um ambiente homogêneo, mas hoje sabe-se que é composto de nichos especializados, de células B e de células hematopoiéticas. Após atingir a maturidade, emigram para os órgãos linfoides secundários como baço e linfonodos, mediante o reconhecimento de receptores específicos nestes órgãos (MATSUNAGA et al., 2012; ICHII et al., 2014; SAKAI; KOBAYASHI, 2015).

Após uma resposta imune, os linfócitos B podem passar por uma série de eventos moleculares num determinado centro germinal, quando ativadas por linfócito T, para se tornarem células de memória. Os linfócitos B também podem ser ativados para diferenciar-se em plasmócitos, e atuar na imunidade adaptativa produzindo anticorpos que reconhecem, com especificidade, antígenos estranhos com potencial

nocivo. A ligação do anticorpo inativa diversos patógenos ou marca-os para serem fagocitados pelas células do sistema imune inato (DOGAN et al., 2009).

O processo de desenvolvimento dos linfócitos T envolve diversas etapas migratórias no timo, um órgão que propicia o ambiente para a diferenciação e seleção dos linfócitos T. O estágio mais imaturo é definido como Duplo-Negativo (DN) CD4⁻ CD8⁻. Nesta etapa, ocorrem rearranjos genéticos e intensa proliferação celular, de modo que se tornam Duplo-Positivas (DP) CD4⁺ CD8⁺. Após a seleção positiva (processo em que os linfócitos capazes de se ligar ao MHC com baixa avidéz são poupados da morte por negligência), os timócitos DP migram à região córtico-medular onde apresentam fenótipo Simples-Positivo (SP) CD4⁺ CD8⁻ ou CD4⁻ CD8⁺, e a célula sofrerá destruição no processo de seleção negativa se apresentar fenótipo que pode reagir a antígenos próprios (JORDAN et al., 2001; TAKAHAMA, 2006; SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008).

Após a maturação no timo, os linfócitos T *naive* vão para a circulação sanguínea e, como os linfócitos B, entram nos órgãos linfoides secundários ao atravessar as vênulas de endotélio alto. Uma vez nestes órgãos, permanecem em intensa atividade migratória, até seu contato com células apresentadoras de antígeno. Após o reconhecimento de antígeno específico, reduzem drasticamente sua migração e tornam-se ativadas, proliferam e deixam os linfonodos (LAFOURESSE et al., 2013).

As principais classes de células T são a citotóxica (CD8⁺), T auxiliares e as T reguladoras (Thelper e Treg respectivamente, ambas CD4⁺). As células T citotóxicas induzem a morte celular pela produção de citocinas citotóxicas. As células T auxiliares, por sua vez, atuam para auxiliar a ativação de macrófagos, células dendríticas, células B, bem como na produção de citocinas e apresentação de proteínas coestimuladoras. As T regulatórias atuam de modo semelhante, porém para inibir as T auxiliares, T citotóxicas e células dendríticas, suprimindo assim a inflamação com a produção de citocinas anti-inflamatórias e outros mecanismos resolutivos como redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias, e bloqueio de vias de sinalização relacionadas à função pró-inflamatória de algumas células (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Há ainda os linfócitos T exterminadores naturais ou "*natural killer*" (NK), que levam à morte celular, porém sem necessidade de um reconhecimento prévio de antígeno (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

No processo imune, o linfócito T reage aos antígenos mostrados pelas células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas. As células dendríticas internalizam patógenos ou seus subprodutos, e apresentam às células T auxiliares que se encontram no tecido, ou migram aos órgãos linfoides secundários e lá mostram às células T virgens, levando à sua ativação como célula efetora (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Com este processo, a célula T é capaz de matar uma célula hospedeira infectada. Além disso, outros tipos de células T produzem moléculas que ativam macrófagos a destruir os patógenos invasores, ou ativam linfócitos B a produzirem anticorpos, entre outras células (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

3.3 Papel do linfócito na inflamação

Embora os linfócitos sejam um componente da imunidade adaptativa, eles estão implicados também na resposta vascular na inflamação aguda – característico da imunidade inata. Linfócitos T têm um papel em melhorar adesão leucócito-endotelial, mediando ligações em moléculas chave de adesão e aumentando o extravasamento de proteínas para o tecido adjacente (KVIETYS; GRANGER, 2012).

O recrutamento de leucócitos na fase aguda é realizado pela ligação de receptores quimiotáticos acoplados à proteína G, e selectinas. Isso acarreta em ativação de integrinas $\beta 2$, que facilita a captura e adesão de leucócitos do lúmen vascular (SIMON; GREEN, 2005; KVIETYS; GRANGER, 2012).

Ao serem recrutadas ao tecido inflamado, as células inflamatórias terão que atravessar a barreira endotelial, realizando o processo chamado de migração transendotelial. Mudanças hemodinâmicas levam à marginação do linfócito. Há marginação, rolamento e adesão fraca, através de selectinas, reduzindo a velocidade dos linfócitos na corrente sanguínea. Em seguida, há a adesão pela ligação forte com integrinas e outras moléculas de adesão, decorrente da ativação celular, que resulta em expressão e mudanças conformacionais de integrinas de alta afinidade. Por fim, há a transmigração propriamente dita, ou diapedese, onde a célula pode passar entre duas células endoteliais (paracelular), ou atravessando uma célula (transcelular) (SIMON; GREEN, 2005; LEY et al., 2007; MITROULIS et al., 2015; SAKAI; KOBAYASHI, 2015).

A captura de leucócitos é devida à L-selectina (CD62L), que reconhece ligantes de glicoproteínas em leucócitos e no endotélio ativado. O rolamento também é suportado por selectinas endoteliais como P-selectina (CD62P) e E-selectina (CD62E), sobrerregulados na superfície celular endotelial após o estímulo de moléculas como citocinas ou histamina. Ainda participam outros ligantes como a Molécula de Adesão Intracelular-1 (ICAM-1) e Molécula de Adesão Vascular (VCAM) (SIMON; GREEN, 2005; LEY et al., 2007; KVIETYS; GRANGER, 2012; CHOUDHARY et al., 2015).

As integrinas são moléculas transmembranares, heterodiméricas, constituídas por duas subunidades α e β . São conhecidas mais de 19 subunidades α e 8 subunidades β , e mais de 20 integrinas já foram descobertas. São receptores que devem ser ativados para desempenhar seu papel, e a avidéz da ligação influencia no evento adesivo, dependendo da afinidade à integrina e valência da ligação feita. Estes fatores dependem, respectivamente, da mudança conformacional de cada heterodímero ao ser ativado, e da densidade de integrinas por área da membrana plasmática envolvida na adesão celular (SIMON; GREEN, 2005; LEY et al., 2007; FUJITA et al., 2014; SEGUIN et al., 2015).

A regulação da adesão mediada por integrinas é um processo complexo, pois são conhecidas 47 proteínas diretamente ligadas ao fenômeno, e estas se estendem a uma rede de 900 proteínas indiretas, e mais de 6.000 interações proteína-proteína, que confere especificidade e diversidade nos mecanismos de sinalização (LEY et al., 2007; SEGUIN et al., 2015).

Integrinas ativadas participam mediando a adesão. A força da interação de cada integrina é definida como avidéz, e tanto a afinidade intrínseca da integrina como a sua valência contribuem para a avidéz. A “afinidade” representa a força de uma ligação individual de uma integrina ao seu ligante, regulada pelo estado conformacional de suas subunidades. A valência é mediada pelo número de ligações ou agrupamento (clustering) dos receptores de integrina na superfície celular, efetuando várias ligações em conjunto. Na ausência de ligantes, as integrinas tendem a permanecer em estado inativo, com conformação dobrada (CARMAN; SPRINGER, 2003; MITROULIS et al., 2015).

O Antígeno-4 muito tardio, VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), é uma integrina expressa na superfície de linfócitos e leucócitos, com exceção de neutrófilos, e está envolvida no recrutamento destas células e na adesão endotelial, podendo se ligar a fibronectina

ou VCAM-1, facilitando a migração de linfócitos da via sanguínea para os demais tecidos. Também favorece a sinapse imunológica entre células apresentadoras de antígeno e linfócitos T e sinais co-estimulatórios para a ativação dos linfócitos T e B (ESCRIBESE et al., 2007; SOLER et al., 2009; MATSUNAGA et al., 2012; FUJITA et al., 2014; BROWN et al., 2014; SPADARO et al., 2015).

L-selectina (CD62L) é outra importante molécula envolvida no rolamento e transmigração, expressa na superfície de linfócitos e outros leucócitos, regulando a migração dos leucócitos aos sítios inflamatórios e a recirculação de linfócitos entre o sangue e os tecidos linfoides pelas vênulas de endotélio alto (CHOUDHARY et al., 2015; SPADARO et al., 2015).

Choudhary e colaboradores (2015) identificaram a superexpressão de CD62L como um fator de agressividade tumoral de câncer de bexiga, sendo um diferencial para avaliação do prognóstico da doença. Células neoplásicas de outros tipos de câncer que exibem uma expressão anormal de CD62L também demonstram maior capacidade de realizar metástase (CHOUDHARY et al., 2015).

Quimiocinas são citocinas que se ligam a GPCRs e agem como importantes reguladores da adesão e migração celulares. As quimiocinas podem ser classificadas como homeostáticas, promovendo o desenvolvimento e manutenção da homeostase celular e tecidual do sistema imune, ou como inflamatórias, que podem ser induzidas e sobre-reguladas por estímulos inflamatórios (BACHELERIE, 2010; LOMBARDI et al., 2013; GUYON, 2014).

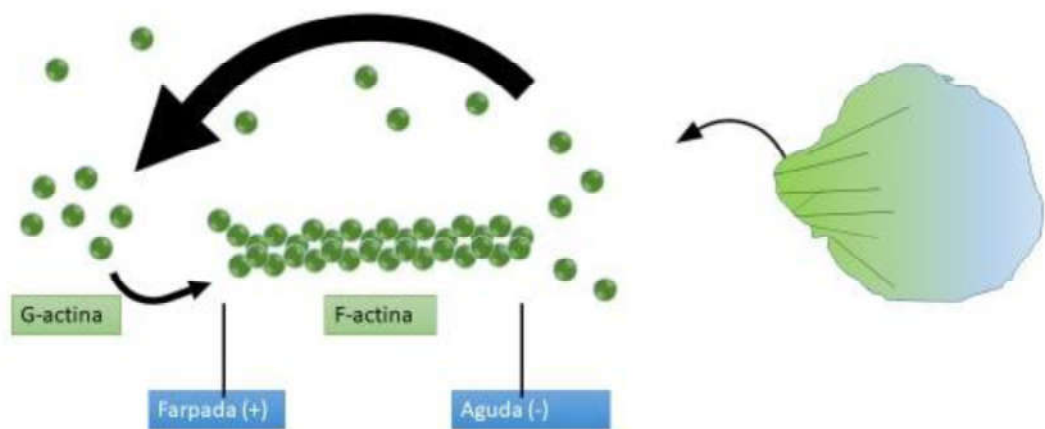
A Quimiocina CXC *motif* ligante 12, a (CXCL12) ou Fator-1 derivado de célula estromal (SDF-1) é uma molécula que atua como quimioatraente, através do receptor CXCR4. Sinais quimiotáticos atuam através de seus receptores cognatos resultando em polimerização e reorganização do citoesqueleto e consequente formação de lamelipódio e uropódio celular (TAKAHAMA, 2006; BACHELERIE, 2010; FREELEY et al., 2012; LAFOURESSE et al., 2013; LOMBARDI et al., 2013; GUYON, 2014).

Migração é uma característica constitutiva de determinadas células que exibem um movimento de arrasto, devido a participação de moléculas de adesão e constante reorganização do citoesqueleto de actina (ESCRIBESE et al., 2007; BROWN et al., 2011; ROUGERIE et al., 2013; AKHSHI et al., 2014; HOEFERT et al., 2016; RAMÍREZ-SANTIAGO, 2016). Para que ocorra a migração, linfócitos realizam o movimento ameboide, com protrusão e contração, que decorre de mudanças conformacionais em três etapas: extensão do lamelipódio ou "*leading edge*", tração

da região central e retração do uropódio (SMITH et al., 2005; ESCRIBESE et al., 2007; LAFOURESSE et al., 2013; RAMÍREZ-SANTIAGO, 2016).

Embora os fatores e fenótipos de células migrantes variem bastante, todas as células deverão passar por reorganização do citoesqueleto. Isto depende da actina, um componente essencial à vida, e evolutivamente bem conservado em seres eucarióticos, e ainda em parte dos procariotos. Essa estrutura provê força de tração e arquitetura, para manutenção da forma e da mobilização; e arcabouço de componentes celulares; exocitose, endocitose, movimentação de organelas, polarização na divisão celular (ESCRIBESE et al., 2007; BEREPKI; LICHIOUS; READ, 2011; AHRENS et al., 2012; GUNNING et al., 2015; SHEKHAR; PERNIER; CARLIER, 2016).

Figura 1 – Forma globular da actina é polimerizada na extremidade farpada para executar funções como a movimentação celular e de organelas.



Fonte: Autor, 2017.

A dinâmica de actina depende de um constante e equilibrado ciclo de assimilação e dissimilação (Figura 1) desta proteína em suas formas monomérica ou globular (G-actina) e polimerizada ou filamentosa (F-actina). A célula dispõe de uma quantidade finita e exaurível de subunidades G-actina, que fica disponível para assimilação em filamentos pela ação de diferentes proteínas (BEREPKI; LICHIOUS; READ, 2011; RIVELINE et al., 2014; SHEKHAR; PERNIER; CARLIER, 2016).

Este filamento é formado com o objetivo de gerar força protrusiva levando a lamelipódios e filopódios, e ainda participa na endocitose e remodelamento do

complexo de Golgi. Processos como adesão, sinapse imunológica, citocinese também são influenciadas pela actina, junto a outras proteínas (BEREPIKI; LICHIOUS; READ, 2011; RIVELINE et al., 2014).

Se o filamento de actina (Figura 1) for dividido em extremidade farpada (“+”), centro e extremidade aguda (“-”), por conseguinte teríamos maior frequência de F-actina na porção central do filamento. Devido à faloidina-FITC se ligar à F-actina, é possível identificar populações com filamentos mais longos inferindo das células com maior intensidade de fluorescência (ZEPEDA et al., 2014; SHEKHAR; PERNIER; CARLIER, 2016).

Para a dinâmica de assimilação e dissimilação da actina, as proteínas da família de Cofilina/Fator despolimerizante de Actina (ADF) atuam na porção caudal do filamento de actina, despolimerizando-a (XU et al., 2013). A via de sinalização PI3K/Akt desempenha papel importante no citoesqueleto celular, permeabilidade, migração, proliferação e apoptose (XU et al., 2013; YANG et al., 2015; HLUSHCHENKO; KOSKINEN; HOTULAINEN, 2016; SHEKHAR; PERNIER; CARLIER, 2016).

O citoesqueleto de F-actina é modulado por outras famílias de proteínas como as proteínas de ramificação (ex: complexo Arp2/3 e profilinas), de separação (ex: cofilinas), confecção (gelsolina) e de empacotamento (plastinas), e ainda as RhoGTPases como Rac1 e Rho (ESCRIBESE et al., 2007; LAFOURESSE et al., 2013; ROUGERIE et al., 2013; GUNNING, 2015; HLUSHCHENKO; KOSKINEN; HOTULAINEN, 2016).

3.4 Terpenos e produtos de plantas para fins terapêuticos

Plantas medicinais são espécies vegetais a partir das quais produtos de interesse terapêutico podem ser obtidos e usados como medicamento. Ou seja, são aquelas que se mostram eficazes para aliviar, prevenir, ou curar doenças, alterar processos fisiológicos e patológicos, ou ainda, servir de fonte de drogas ou seus precursores (OMS, 1999; RATES, 2001; OMS, 2002; COAN; MATIAS, 2014; CHANG; KWON, 2016).

O uso de plantas medicinais é tão antigo quanto a civilização humana, sendo, historicamente, a principal fonte de tratamento, junto a minerais e produtos de animais. Descobertas paleontológicas remontam seu uso há pelo menos 60 mil anos, na região

que hoje é o Iraque. Por vezes, o uso de plantas medicinais esteve associado à cultura ou significados místico-religiosos (RATES, 2001; PRACHAYASITTIKUL et al., 2015; VALENÇA; Da SILVA; BORDINI, 2015; AYRLE et al., 2016; SKIRYCZ et al., 2016; SPONCHIADO et al., 2016; SHAWAHNA, JARADAT, 2017).

A preferência ao tratamento fitoterápico diminuiu bastante após a Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica e de substâncias sintéticas. A obtenção de substâncias isoladas ou sintéticas mostrou-se uma opção alinhada ao momento de mudanças, além de significar uma quebra de práticas relacionadas à superstição, de valor farmacológico questionável (RATES, 2001; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

No contexto político brasileiro, a fitoterapia está respaldada principalmente na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, pela portaria MS 971 de 03/05/2006 (MS/BRASIL, 2006a); na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos sob o Decreto de número 5.813, de 22/06/2006 (MS/BRASIL, 2006b); e no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos) (MS/BRASIL, 2008). Estes fatores contribuem para o desenvolvimento de pesquisa sobre o uso e melhoramento de produtos naturais, fato observado pelo aumento significativo de publicações no período seguinte à implementação das políticas (CALIXTO; JUNIOR, 2008).

Atualmente, dos 5570 municípios brasileiros, há registro de ações informativas e intervenção em prol da fitoterapia em cerca de 350 destes, e o número reduzido de 53 publicações até 2014, demonstra a sub-representação científica da prática fitoterápica no Brasil (VALENÇA; Da SILVA; BORDINI, 2015).

No entanto, o uso da fitoterapia tem grande motivação, com o arsenal terapêutico crescente, aproveitamento do conhecimento tradicional, preservação da biodiversidade, estímulo à agroecologia, redução de efeitos colaterais indesejáveis, a própria eficácia de determinadas plantas, bem como educação e desenvolvimento social (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014; SHAWAHNA, JARADAT, 2017). Não obstante, as plantas medicinais têm sido a fonte primária usada no tratamento de diferentes enfermidades por cerca de 65 a 80% da população mundial, e muitas têm se mostrado úteis no tratamento de diversas injúrias e desordens inflamatórias, sendo usadas na forma de chá, ou ainda em variadas preparações como tinturas, extratos fluidos, pó, pílulas e cápsulas (OMS, 1999; RATES, 2001;

VALENÇA; Da SILVA; BORDINI, 2015; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

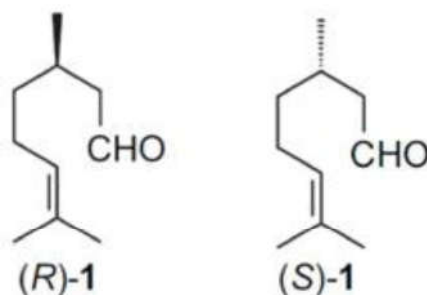
As plantas medicinais podem fornecer substâncias precursoras para a síntese de compostos com propriedades biológicas melhoradas, devido a interessante variedade estrutural dos metabolitos presentes nas espécies vegetais (NICOLAOU et al., 2012). Diante das diferentes aplicações de plantas medicinais é importante que estudos sejam conduzidos para isolar e caracterizar os efeitos biológicos dos constituintes das espécies vegetais (CALIXTO, 2000; FENNELL et al., 2004; SPONCHIADO et al., 2016).

Dentre as diferentes classes de metabólitos secundários presentes em plantas medicinais, destaca-se a classe dos terpenos, que estão entre as maiores classes de compostos naturais sendo encontrados em diversos organismos do reino animal e vegetal (MO; ELSON, 2004; PATRA et al., 2013). Oriundos do metabolismo secundário, terpenos são divididos de acordo com o número de unidades isoprênicas C₅, geradas pela via do ácido mevalônico ou 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato, e são encontrados nas diferentes partes das espécies vegetais (GUIMARAES et al., 2014).

3.5 Citronelal

O citronelal (3,7-dimetil-6-octen-1-al) é um monoterpeno tipicamente isolado como uma mistura não-racêmica de seus enantiômeros levogiro e dextrogiro (Figura 2), principalmente pelo método de destilação a vapor. Está presente em espécies vegetais como a *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus*, *Corymbia citriodora* e *Eucalyptus citriodora*, sendo encontrado, em quantidades variáveis, em óleos essenciais de mais de 50 espécies (KOBAYASHI et al., 2009; MELO et al., 2010; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010; MULYANINGSIH et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011b; ALTSHULER et al., 2013; WEI; WEE, 2013).

Figura 2 – Estrutura molecular dos Enantiômeros “+” ou “R”, e enantiômero “-” ou “S” do citronelal.



Fonte: Melo et al. (2011b).

Por ser uma substância oriunda do metabolismo secundário, a quantidade ou teor encontrado nas plantas depende da espécie, fenótipo e fatores ambientais (PATRA et al., 2013; GUIMARAES et al., 2014; SKIRYCZ et al., 2016).

Embora haja escassez de estudos sobre biodisponibilidade e metabolismo do citronelal, Roberts e colaboradores (1991) concluíram que 2,6-dimetil-1,5-heptadieno é um dos produtos do metabolismo hepático do citronelal, por deformilação oxidativa a partir das enzimas de citocromo P450 2B4. Em coelhos, Ishida, Toyota e Asakawa (1989) encontraram como principais metabólitos o (-)trans-mentano-3,8-diol e o (+)-cis-mentano-3,8-diol representando dois terços dos metabólitos.

Compostos contendo citronelal são mais conhecidos pelo uso em repelentes, que tem aplicabilidade em prevenção de doenças transmitidas por mosquitos e outros insetos (SOLOMON et al., 2012; SONGKRO et al., 2012). Este terpeno tem um cheiro característico, sendo usado popularmente em temperos, aromaterapia e indústria de cosméticos como sabão e perfumes. Além da percepção olfatória, há trabalhos que indicam outros efeitos por via olfatória, reduzindo a libido em ratos (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011; OSADA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2014).

O citronelal é conhecido também por sua atividade frente a diferentes microrganismos (OLIVEIRA et al., 2011a; ZORE et al., 2011; TOLBA et al., 2015), onde estudos demonstram seu efeito antifúngico e redutor de adesividade de *Candida albicans* em implantes dentários (TRINDADE et al., 2015), bem como atividade antitripanossomal frente a *Trypanosoma brucei* (KPOVIESSI et al., 2014).

A maioria dos trabalhos que avaliam as atividades biológicas do citronelal utilizam modelos experimentais *in vivo*. Melo e colaboradores (2010) avaliaram os efeitos do (RS)-(±)-citronelal administrado intraperitonealmente em camundongos

Swiss, e observaram seu efeito antinociceptivo em testes de contorção abdominal, teste de formalina e placa quente. Este estudo demonstrou ainda que os efeitos antinociceptivos do citronelal foram revertidos pela administração de naloxona, um antagonista não seletivo de receptores opióides, sugerindo o envolvimento de tais receptores no efeito observado pelo citronelal.

Diversos outros estudos demonstram os efeitos do citronelal em reduzir a dor inflamatória (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011), que pode estar relacionada a efeitos anti-inflamatórios, como a capacidade de atenuar a migração leucocitária (MELO et al., 2011a) e efeitos antioxidantes observados em diversos testes (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011). Cabe destacar que estes e outros estudos já reportaram os baixos efeitos tóxicos associados ao uso deste terpeno (BATUBARA et al., 2015). No entanto, os mecanismos anti-inflamatórios envolvidos na redução da migração de leucócitos ao sítio da inflamação, bem como seu efeito sobre linfócitos, um importante leucócito envolvido em diferentes respostas inflamatórias ainda não foram esclarecidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

O citronelal (C₁₀H₁₈O; P.M. 154,25; (±) com pureza ≥ 95%), Brometo Azul de tiazolil tetrazólio (MTT), faloidina-FITC, RPMI-1640, L-glutamina, salina fosfato tamponada (PBS) e albumina bovina sérica foram todos adquiridos da Sigma-Aldrich. A quimiocina CXCL12/SDF-1-α foi obtida da empresa R&D systems.

Cytofix/Cytoperm e anticorpo para moléculas de adesão anti-VLA-4 PE foi obtido de BD Biosciences, e anti-CD62L foi obtido de eBiosciences.

4.2 Obtenção de células e tratamento

Os linfócitos foram obtidos de linfonodos de camundongos C57BL/6 fêmeas (10-20 g, 4-12 semanas) fornecidos pelo Biotério Central da UFAL e mantidos sobre condições adequadas de controle do ciclo claro-escuro de 12/12 h e com acesso livre à ração e água. Todos os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional (Nº 028370/2010-07).

Para obtenção dos linfócitos, camundongos C57BL/6 foram mortos com aprofundamento anestésico de tiopental-sódico (100 mg/Kg) para a obtenção de seus linfonodos subcutâneos que, em seguida, foram macerados em placa de 24 poços com meio de cultivo RPMI-1640 e lavados por centrifugação. A contagem do número total de células foi realizada com auxílio do azul de Trypan em câmara de Neubauer utilizando microscópio óptico (Invertido, modelo IX70, Olympus).

As células foram mantidas *in vitro* utilizando meio de cultivo RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) inativado, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/mL de streptomina em estufa incubadora a 37°C e 5% de CO₂. O cultivo e manutenção das células nas placas de cultura foi de 3x10⁷ células por poço em 1 mL de meio, em placa de 24 poços, ou 2x10⁵ células por poço em 200 µL de meio, em placa de 96 poços, também utilizando RPMI-1640 suplementado como meio de cultivo e veículo para diluição e tratamento.

As células foram expostas ao citronelal (3R-3,7-dimetil-6-octenal), obtido da Sigma-Aldrich, e diluído em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF para

exposição às células, baseando-se em trabalhos como o de Altshuler et al. (2013) e MAßBERG et al., (2015), em diferentes concentrações de 0,0065, 0,065, 0,65 e 6,5 μM , que correspondem respectivamente às concentrações de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Após o tratamento por 1 hora as células foram centrifugadas (1500 rpm a 4°C, por 10 minutos) para substituição do meio de cultura sem citronelal. O grupo controle foi feito com células que foram submetidas apenas ao meio (veículo).

4.3 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A avaliação do efeito do citronelal sobre a viabilidade de linfócitos foi realizada por meio do ensaio colorimétrico do Brometo Azul de Tiazolil Tetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983; Guimarães et al., 2012). Os linfócitos foram plaqueados (2×10^5 células/200 μL de meio RPMI 1640 suplementado, como descrito na seção anterior) em placas de 96 poços e tratados com citronelal (0,0065 a 6,5 μM) por 1, 6 e 24 horas, mantidos em estufa a 37°C. Após este período, as células foram mantidas com solução de 23 μL de MTT (5 mg/mL) dissolvido em meio de cultura por 4 horas a 37°C. Em seguida, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e foi adicionado 150 μL DMSO. 15 minutos depois foi realizada a leitura da densidade óptica no comprimento de 540 nm com auxílio do leitor de microplacas ThermoPlate® TP-reader.

4.4 Ensaio de migração celular

A migração é uma função primordial para a atuação do linfócito, e para avaliar o efeito do citronelal sobre a migração desta célula, foram realizados experimentos utilizando câmaras de migração vertical Transwell® com poros de 5 μm (Smaniotto et al., 2005). Insetos de migração podem ser revestidos para prover um ambiente desafiador à migração. Então, antes do experimento, a câmara superior foi embebida com solução contendo 0,1% albumina bovina sérica diluída em PBS por 45 minutos. Em seguida, após a remoção desta solução, os linfócitos ($2,5 \times 10^6$) que foram tratados por citronelal (0,65 μM) durante uma hora, foram depositados na câmara superior para permitir a migração por 3 horas em estufa a 37°C, 5% CO_2 com ou sem estímulo CXCL12 (200 ng/mL) adicionado na parte inferior da câmara. Após a migração, os linfócitos que migraram para a câmara inferior foram colhidos e contados em câmara

de Neubauer, e seguidamente serão submetidos ao procedimento de marcação citofluorométrica (seções a seguir). Como grupo controle foram utilizadas células expostas apenas a meio de cultura (veículo).

4.5 Avaliação de adesão celular

A adesão, uma etapa fundamental para a migração e, portanto, execução das funções dos linfócitos, foi avaliada *in vitro* através do método descrito por Hendesi e colaboradores (2015) modificado. Para tal, uma placa de 6 poços recebeu 1 mL de BSA diluído 1% em PBS/poço, por 1 hora para formação de um substrato para uma melhor sustentação à qual o linfócito irá aderir. Em seguida, a solução de BSA foi substituída por 3 mL de meio de cultura RPMI-1640 contendo 3×10^7 linfócitos/poço, previamente tratados com citronelal (0,65 μ M). Após 1 hora, em estufa incubadora 37°C 5% CO₂, o sobrenadante foi removido para eliminar as células não aderentes. As células aderentes foram removidas por lavagem intensa com PBS a 4°C para contagem em câmara de Neubauer. Após o experimento, as células foram submetidas ao procedimento de marcação citofluorométrica (seções a seguir).

Como grupo controle, foram utilizadas células expostas apenas a meio de cultura (veículo).

4.6 Identificação e análise das subpopulações de linfócitos por citofluorometria

Após o tratamento com citronelal (0,65 μ M) por 1 hora, as células foram lavadas e marcadas com anti-CD4 APC, anti-CD8 PerCP-Cy-5.5, anti-B220 FITC ou anti-B220 PE (eBiosciences), para determinação do subtipo de linfócito. Para as avaliações de moléculas de adesão, utilizou-se anti-VLA4 PE (BD Biosciences) e anti-CD62L APC (eBiosciences).

As leituras foram realizadas no Citômetro de Fluxo FACSCanto II de BD Biosciences. Uma *gate* foi feita excluindo debris e células anômalas no gráfico de pontos (*Dot plot*) no parâmetro Forward vs. Side Scatter, coletando de 10.000 a 20.000 eventos.

As marcações de subpopulações foram delimitadas com *gates* específicas, conforme modelo na Figura 3, sempre considerando eventos dentro da população de linfócitos, e em seguida considerando a marcação de subpopulações.

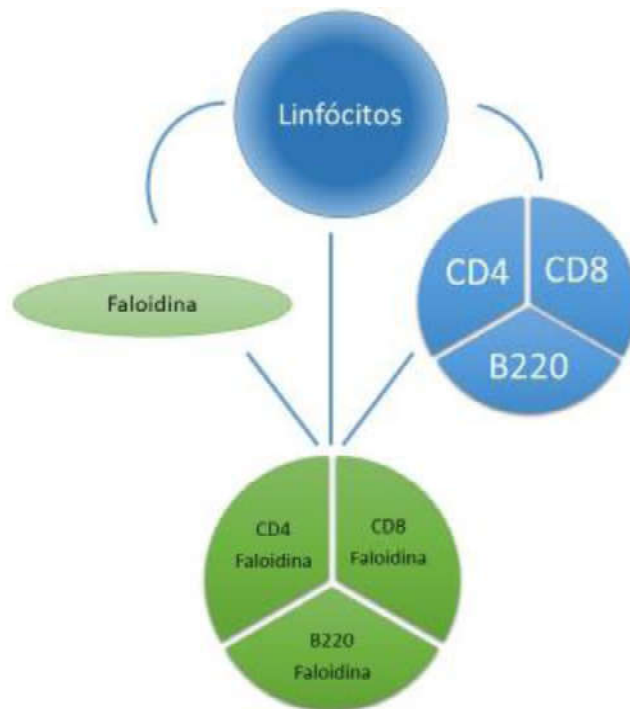
Os dados foram analisados no software Flowing Software 2.5.1.

4.7 Análise da expressão de F-actina por citofluorometria

A faloidina é uma molécula que tem especificidade para se ligar à actina filamentosa. Portanto, foi utilizada faloidina conjugada a FITC para as análises da F-actina nos linfócitos, que foram previamente tratados com citronelal (0,65 μM) por 1 hora, em seguida foram permeabilizados e fixados com a solução Cytofix/Cytoperm (100 μL) por 20 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas com 50 μL faloidina-FITC (Sigma) diluído (1:400) por 40 minutos protegidos da luz. Após centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e foi adicionado PBS para solubilização e estabilização da amostra para leitura por citometria de fluxo. Células sem marcação de anticorpos e faloidina foram utilizadas como padrão de ajuste de voltagem da aquisição e controle negativo de comparação entre amostras.

Para realizar a avaliação do conteúdo de F-actina nas subpopulações, foi utilizado o gráfico *Dot plot* relacionando a marcação conjunta da Faloidina-FITC com os marcadores de células CD4⁺, CD8⁺, e B220⁺, como demonstrado na Figura 3. No histograma de intensidade de fluorescência obtido, observa-se próximo ao valor máximo da média de intensidade de fluorescência (MIF) um padrão diferenciado da fluorescência, que marca aproximadamente 5% da população, onde foi delimitada uma nova *gate* que se refere à população que denominou-se F-actina^{HIGH}.

Figura 3 – Estratégia de *gate* adotada para delimitação de células avaliadas quanto à presença de F-actina em relação às subpopulações.



Fonte: Autor, 2017.

As medições de F-actina foram observadas em histograma de Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) para inferir sua quantidade e determinar as células com aumento desta proteína através da observação do aumento destas médias.

Os dados foram analisados no software Flowing Software 2.5.1.

4.8 Análise estatística

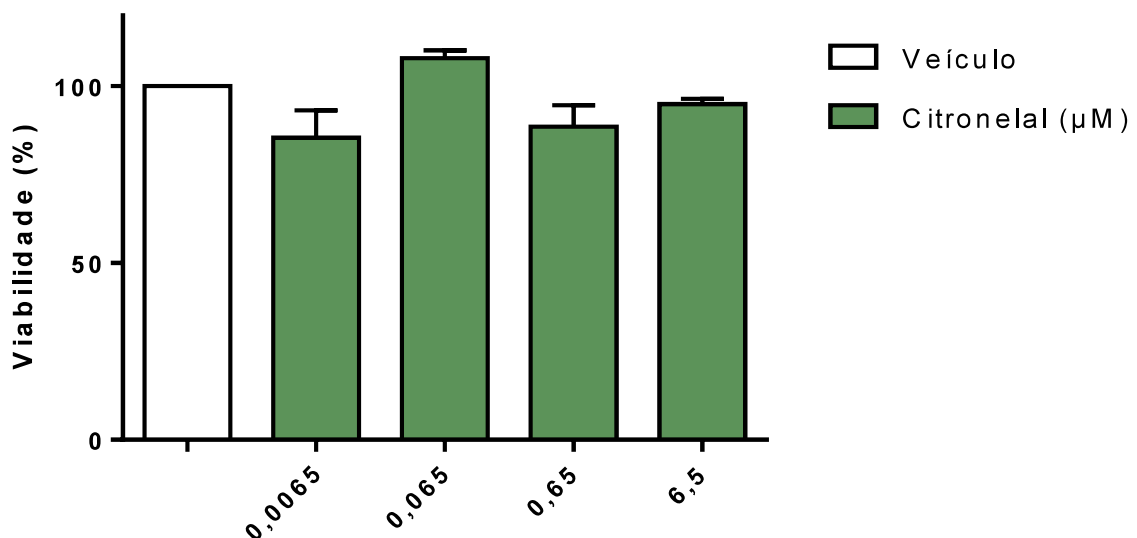
Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Os resultados das avaliações de viabilidade e da migração por quimiotaxia foram analisados por One-way ANOVA e pós-teste Bonferroni. Nas demais análises, foi aplicado teste t de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para tabulação foi usado o programa Excel (Microsoft) e para a análise foi utilizado o Prism 6 (Graphpad Software, Inc).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do citronelal sobre a viabilidade de linfócitos

Através do método MTT, diferentes concentrações (0,0065-6,5 μM) de citronelal foram avaliadas quanto à citotoxicidade em tempos diferentes (1, 6 e 24 horas). Foi possível verificar que o citronelal não reduz significativamente a viabilidade de linfócitos expostos por uma hora às diferentes concentrações testadas (Figura 4).

Figura 4 – Viabilidade celular de linfócitos tratados por 1 hora com citronelal.

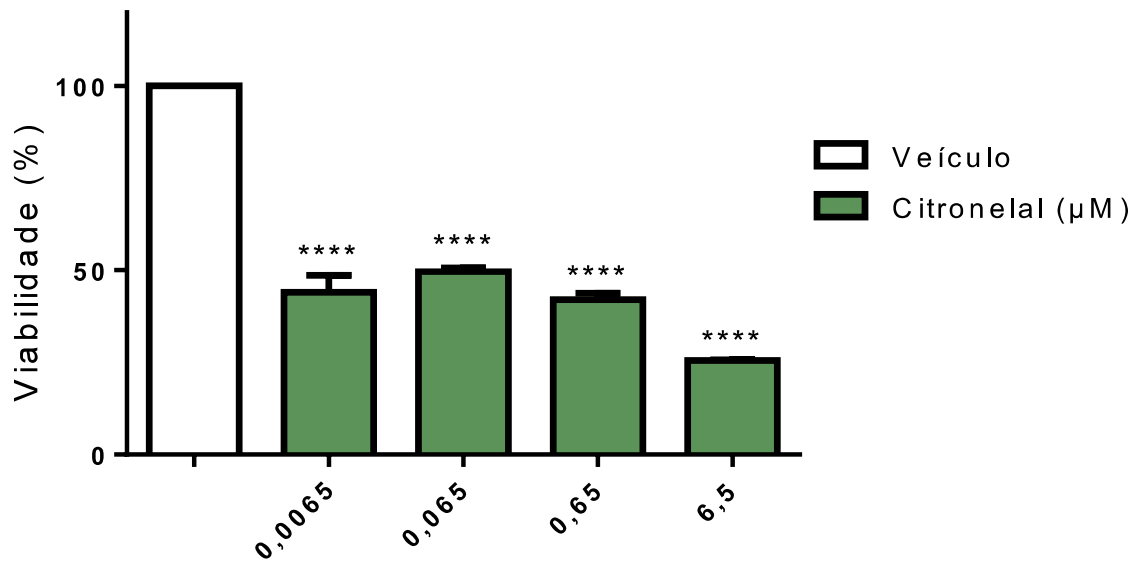


Fonte: Autor, 2016.

Nota: Os linfócitos foram expostos ao citronelal por 1 hora, nas concentrações de 0,0065 a 6,5 μM . Em seguida, as células foram expostas ao MTT por 4 horas, e a reação foi revelada com DMSO e mensurada em espectrofotômetro. As barras representam a média \pm EPM da viabilidade de 3 experimentos independentes.

No entanto, ao avaliar o efeito citotóxico de linfócitos expostos ao citronelal por 6 e 24 horas, observou-se uma redução da viabilidade destas células (Figuras 4 (p. 30) e 5 (p. 31)).

Figura 5 – Viabilidade celular de linfócitos tratados por 6 horas com citronelal.



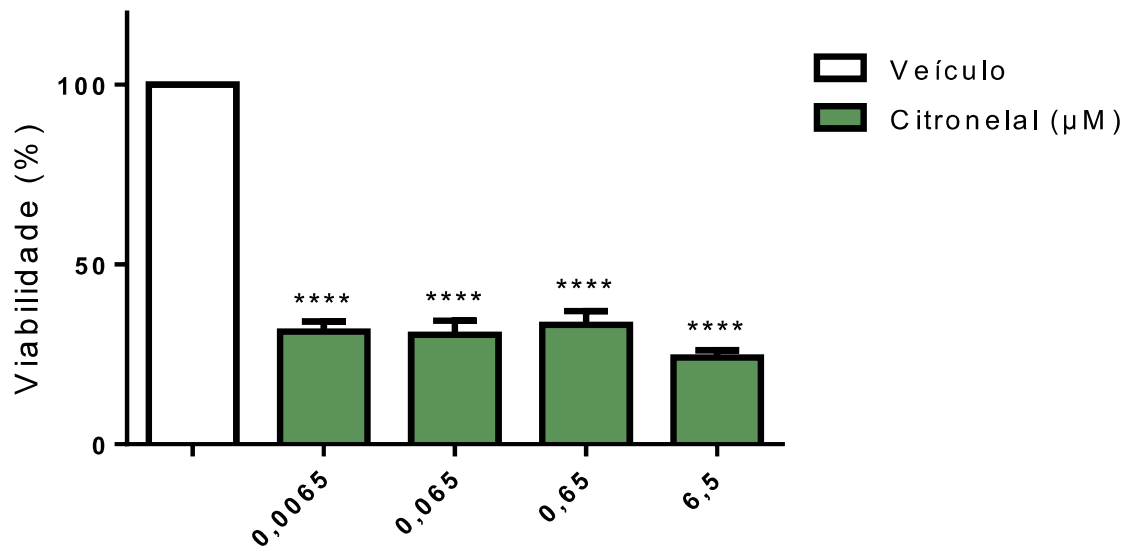
Fonte: Autor, 2016.

Nota: Os linfócitos expostos ao citronelal por 6 horas, em diferentes concentrações, foram submetidos ao método do MTT. As barras representam a média \pm EPM da viabilidade de 3 experimentos independentes. **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle.

Na Figura 5 observa-se que as concentrações até 0,65 μM apresentaram uma redução similar, que variou de 50 a 55% ao se comparar ao grupo controle. No entanto, no grupo tratado com 6,5 μM de citronelal houve uma redução mais expressiva, de 75%.

Quando os linfócitos foram expostos ao citronelal por 24h, observou-se uma maior citotoxicidade nas concentrações inferiores a 0,65 μM , de cerca de 68%, e uma manutenção do efeito citotóxico na concentração de 6,5 μM (Figura 6, p. 31)

Figura 6 – Viabilidade celular de linfócitos tratados por 24 horas com citronelal.

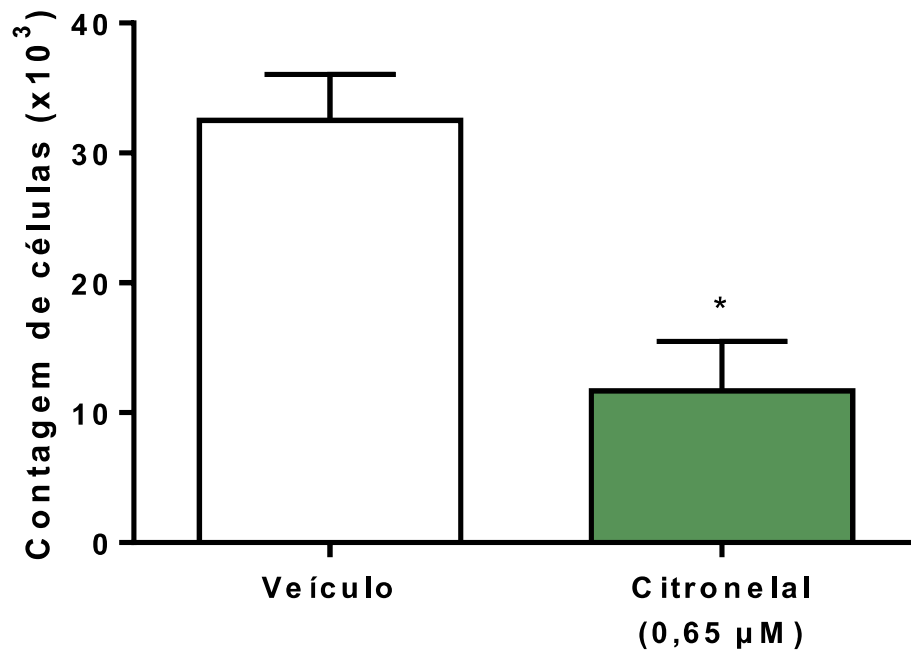


Fonte: Autor, 2016.

Nota: Os linfócitos foram expostos ao citronelal por 24 horas antes da avaliação da viabilidade. As barras representam a média \pm E.P.M. da viabilidade de 3 experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram determinadas com ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. **** representa $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle.

5.2 Efeito do citronelal sobre a migração de linfócitos

Foi observado que o tratamento do citronelal *in vitro* reduziu a capacidade migratória em cerca de 3 vezes, quando comparado aos linfócitos que não receberam tratamento (Figura 7, p. 32), representando uma potente inibição da capacidade migratória.

Figura 7 – Migração espontânea de linfócitos expostos ao citronelal

Fonte: Autor, 2016.

Nota: Efeito do citronelal sobre a migração espontânea de linfócitos *in vitro*. Após a exposição de $2,5 \times 10^6$ linfócitos ao citronelal por 1 h, as células migrantes (recuperadas no compartimento inferior da câmara de migração) foram recuperadas e contadas. As barras representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes. * representa $p < 0,05$ em comparação as células expostas apenas ao meio RPMI-1640 (controle).

Uma vez que há diferentes tipos de linfócitos, que desempenham papéis distintos na imunidade e inflamação, estas células foram avaliadas por citofluorometria, para identificar as subpopulações ligadas ao efeito observado (Figura 8, p. 33). Todos os subtipos de linfócitos foram afetados pelo citronelal, especialmente os linfócitos T: o tipo $CD4^+$ teve migração reduzida em 3 vezes (Figura 8a), e o tipo $CD8^+$ teve sua migração reduzida mais de 4 vezes (Figura 8b). O linfócito B ($B220^+$) teve migração reduzida em 2 vezes (Figura 8c).

Figura 8 – Imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos migrantes

(Continua)

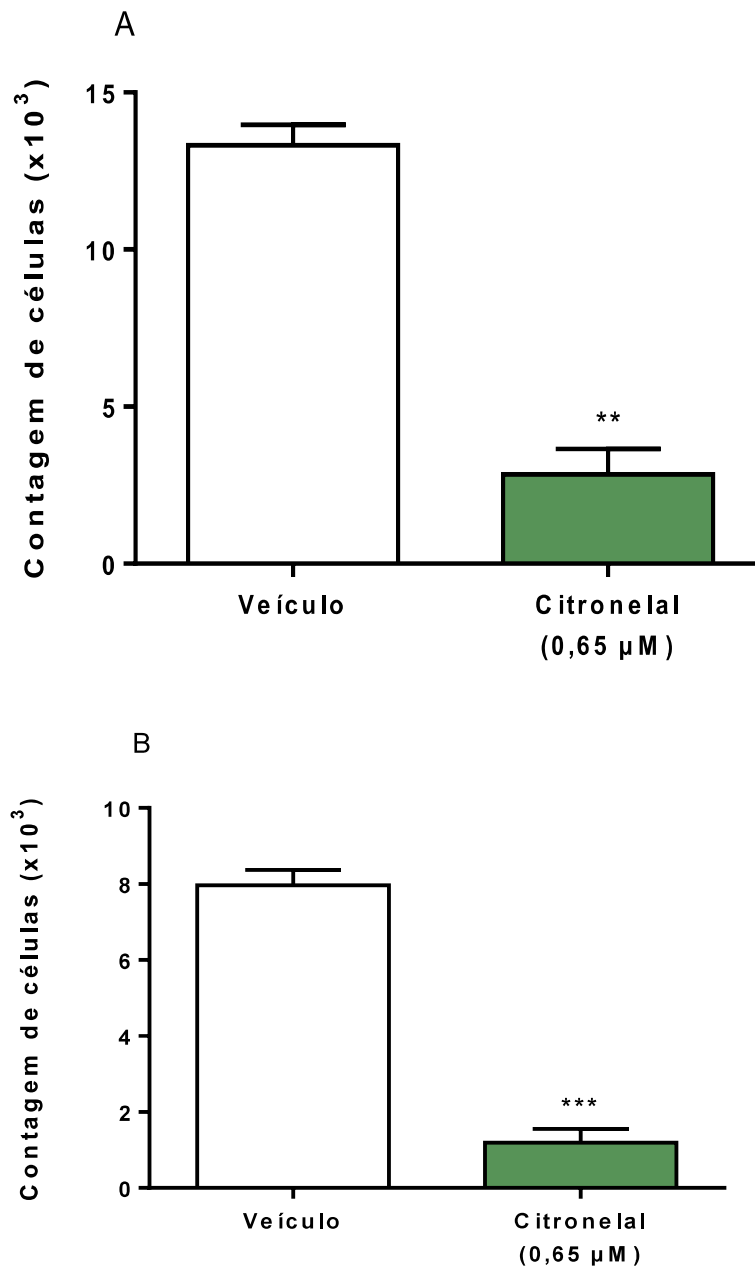
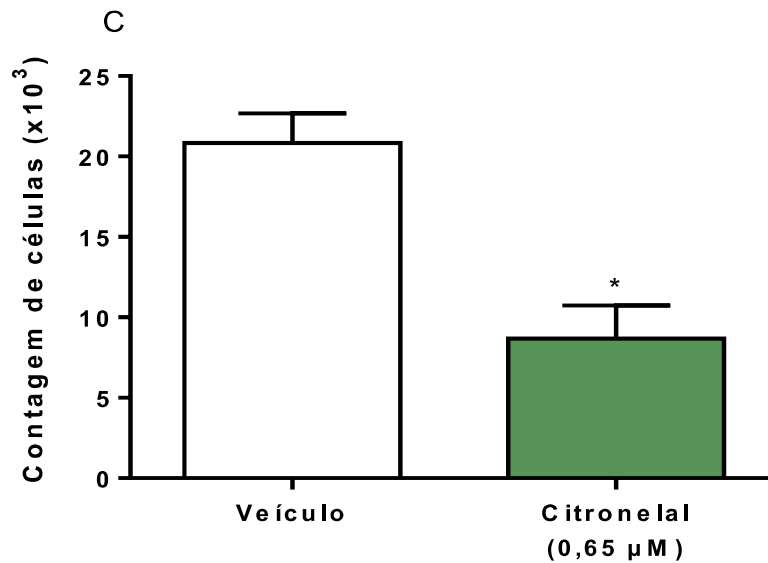


Figura 8 – Imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos migrantes

(Conclusão)



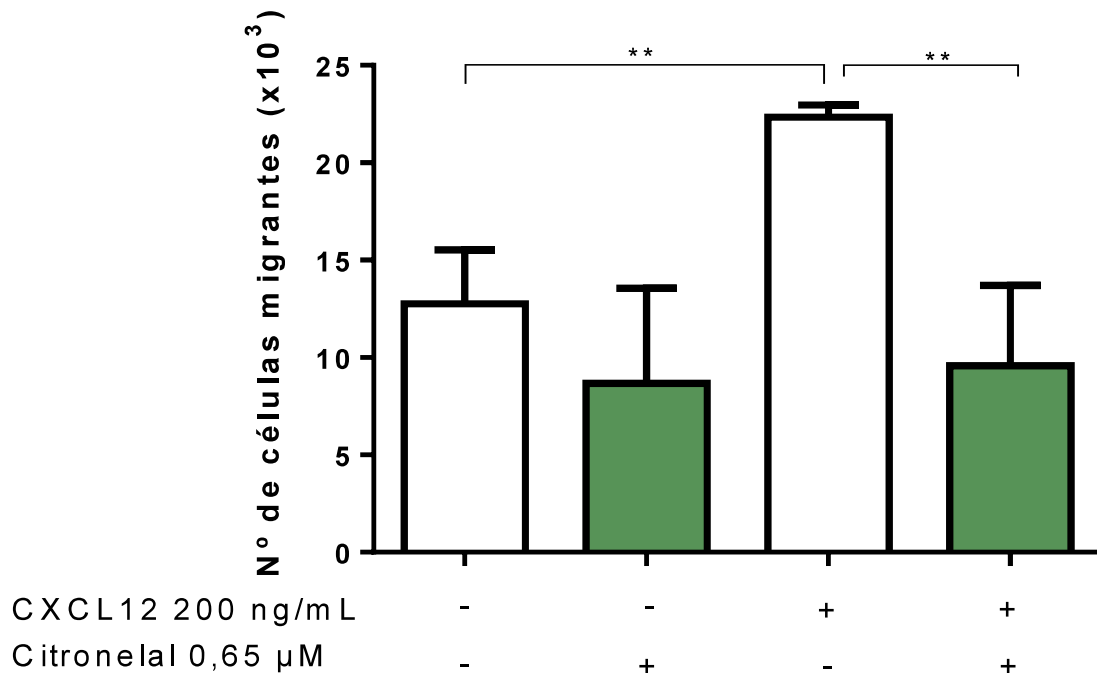
Fonte: Autor, 2016.

Nota: Após migração as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4⁺ (A), anti-CD8⁺ (B) e anti-B220⁺ (C) para identificação do subtipo de linfócito responsivo ao tratamento com citronelal. As barras representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes. * representa p<0,05, ** representa p<0,01 e *** representa p<0,001 em comparação as células expostas apenas ao meio RPMI-1640 (controle).

Um importante aspecto da migração é a quimiotaxia. O uso de quimiotáticos incrementa a atividade migratória, ativando a célula e sua estrutura intracelular. CXCL12 é um conhecido agente quimiotático endógeno que recruta linfócitos através do receptor CXCR4, que é expresso por ambos os linfócitos T e B (DÖRING et al., 2014; GUYON, 2014).

Linfócitos totais estimulados com CXCL12 migraram em maior número para a câmara inferior. As células previamente tratadas com 0,65 µM de citronelal apresentam capacidade migratória menor frente a CXCL12, revertendo o aumento de migração causado por CXCL12 (Figura 9).

Figura 9 – Migração de linfócitos sob efeito do citronelal, induzida por CXCL12.



Fonte: Autor, 2016.

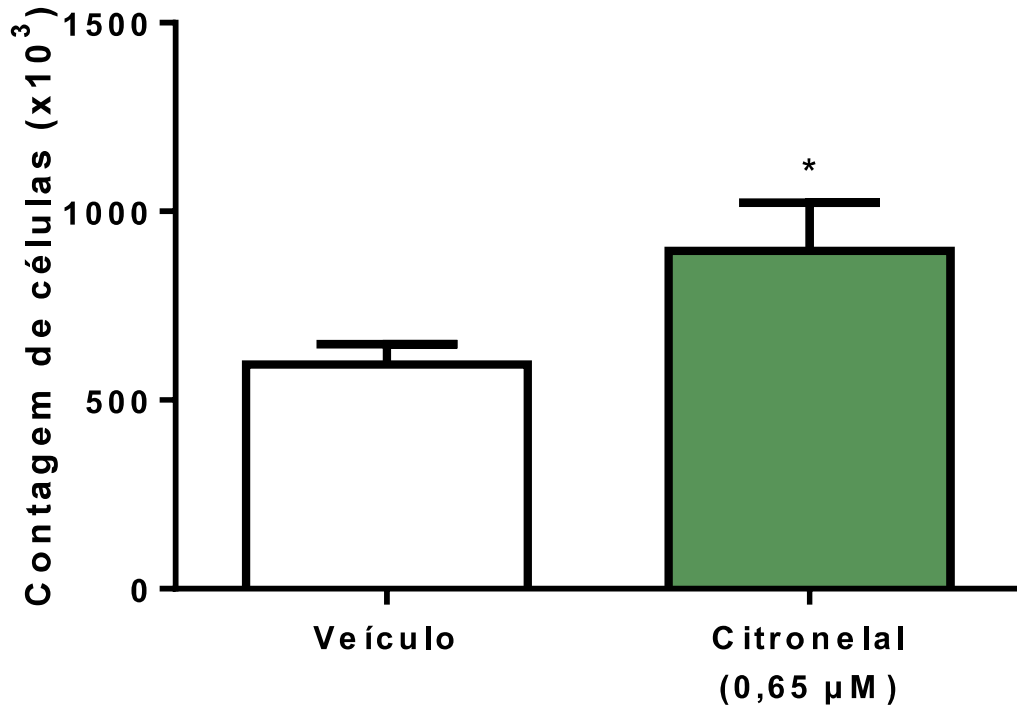
Nota: Após a exposição de $2,5 \times 10^6$ linfócitos ao citronelal por 1 h, as células foram postas a migrar mediante gradiente de concentração da quimiocina CXCL12. Seguindo o tempo de 3 h as células migrantes (recuperadas no compartimento inferior da câmara de Transwell) foram recolhidas e contadas. As barras representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes. ** representa $p < 0,01$ em comparação as células expostas apenas ao meio RPMI-1640 (controle).

5.3 Avaliação da adesão de linfócitos sob efeito de citronelal

A adesão celular se mostra um crucial evento que controla a atividade migratória, uma vez que uma fraca adesão não favorece o avanço da célula a seu objetivo, e por outro lado uma adesão demasiadamente forte pode favorecer a estagnação da célula (KVIETYS; GRANGER, 2012; SAKAI; KOBAYASHI, 2015; RAMÍREZ-SANTIAGO, 2016).

Foi observado que o citronelal estimulou um aumento da adesão destes linfócitos de modo significativo (Figura 10), corroborando com as alterações observadas anteriormente sobre o padrão migratório, ou seja, à medida em que se aumenta a adesão, a função de migração é prejudicada.

Figura 10 – Efeito do citronelal sobre a adesão de linfócitos totais.



Fonte: Autor, 2016.

Nota: Após a exposição de 3×10^7 linfócitos ao citronelal por 1 h, as células foram deixadas aderir por 1 h. Após este período, as células aderentes foram recuperadas e contadas. As barras representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes. * representa $p < 0,05$ em comparação as células expostas apenas ao meio RPMI-1640 (controle).

Figura 11 – Imunofenotipagem dos linfócitos submetidos ao ensaio de adesão.

(Continua)

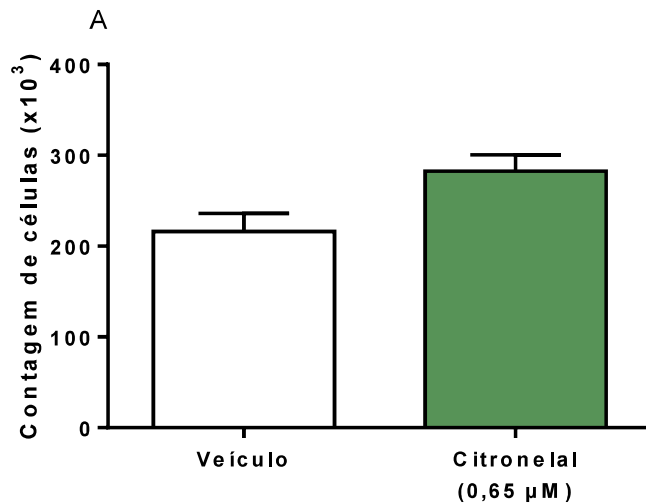
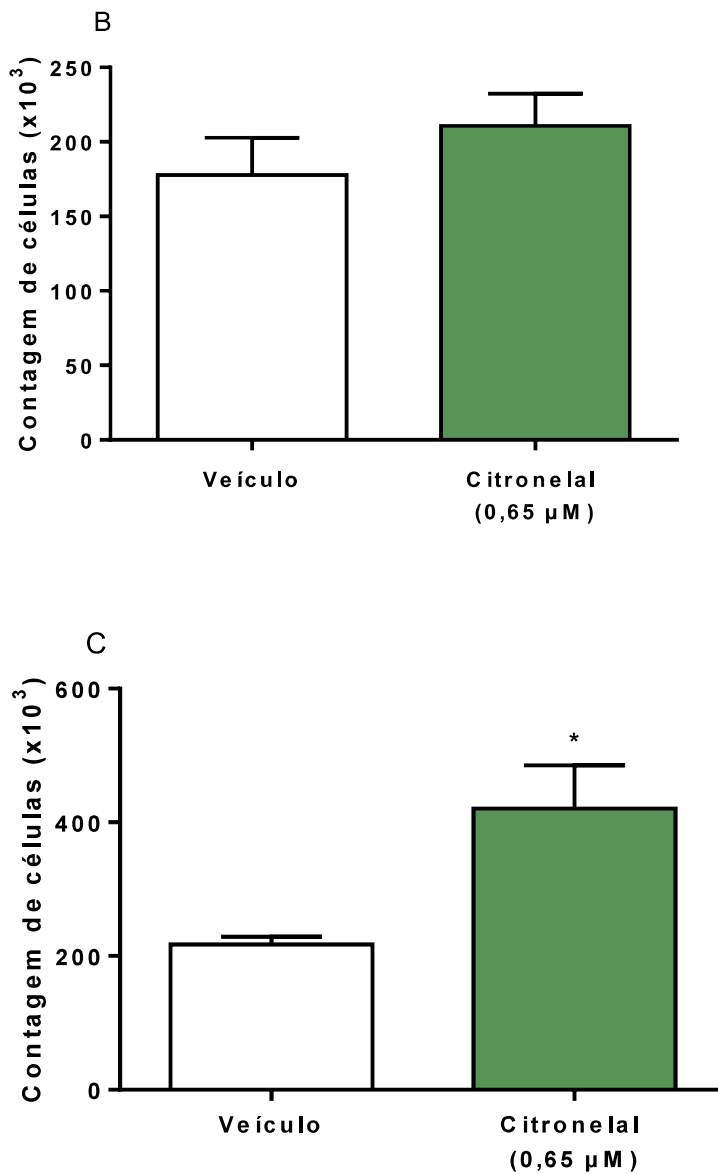


Figura 11 – Imunofenotipagem dos linfócitos submetidos ao ensaio de adesão.

(Conclusão)



Fonte: Autor, 2016.

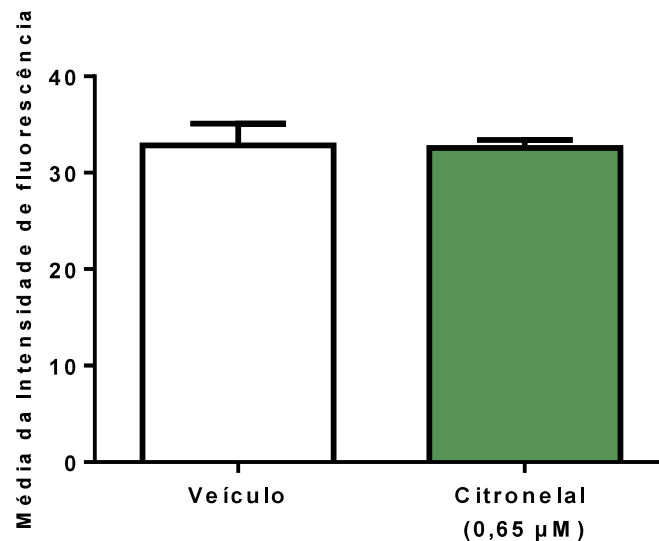
Nota: Após adesão, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 (A), anti-CD8 (B) e anti-B220 (C) para identificação do subtipo de linfócito responsivo ao tratamento com citronelal. As barras representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes. * representa $p < 0,05$ em comparação as células expostas apenas ao meio RPMI-1640 (controle).

Este aumento da adesão foi observado em todas as subpopulações de linfócitos (Figura 11), mas a análise dos dados revelou que apenas os linfócitos B220⁺ alcançaram um aumento estatisticamente significativo (Figura 11c), diferentemente dos linfócitos T, observados nas figuras 10a e 10b.

5.4 Efeito do citronelal sobre moléculas de adesão linfocitárias

As integrinas são moléculas de superfície celular, que por vezes atuam como moléculas de adesão célula-célula e célula-substrato (FUJITA et al., 2014; MITROULIS et al., 2015). Em complemento à alteração da adesão provocada pelo tratamento com citronelal, investigou-se a modulação de duas integrinas de linfócitos sob tratamento de citronelal.

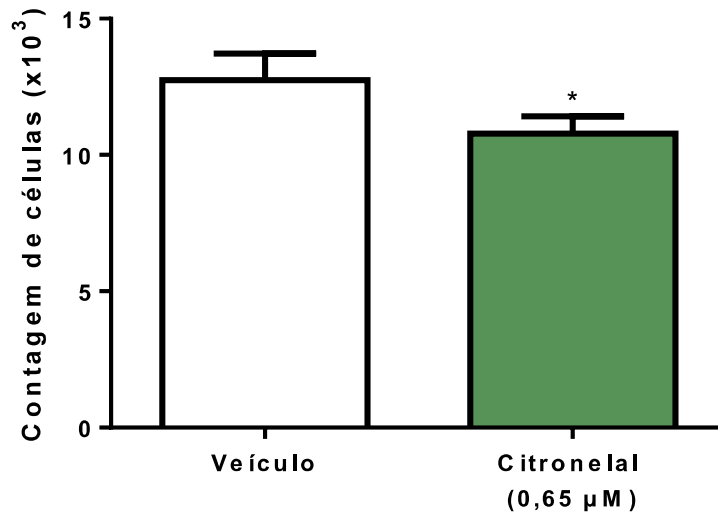
Figura 12 – Expressão média de VLA-4 nos linfócitos.



Fonte: Autor, 2016.

Nota: A análise da MIF do receptor VLA-4 não se mostrou alterada em comparação às células expostas apenas ao veículo RPMI-1640 (controle). As barras representam a média \pm EPM da viabilidade de 3 experimentos independentes.

Figura 13 – Quantitativo de linfócitos positivos para VLA-4.



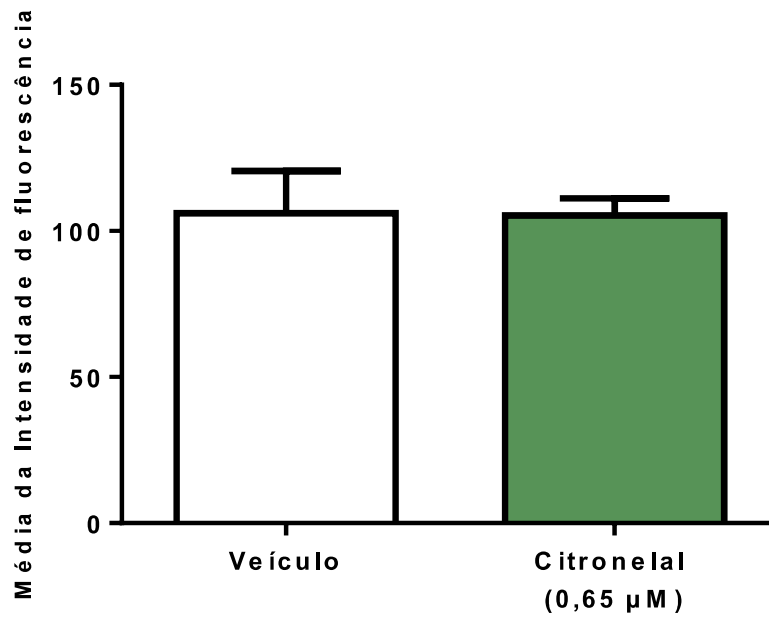
Fonte: Autor, 2016.

Nota: O tratamento com citronelal reduziu a quantidade de células positivas para VLA-4, em comparação ao grupo controle, exposto ao veículo. As barras representam a média \pm EPM da viabilidade de 3 experimentos independentes. * representa $p < 0,05$ em comparação ao grupo que recebeu veículo.

O tratamento com citronelal não alterou a quantidade média de moléculas VLA-4 por célula, expressa pela MIF, como visto na Figura 12. No entanto, a quantidade de células positivas para VLA-4 foi ligeiramente reduzida pelo tratamento com o citronelal (Figura 13).

Quando foi avaliada a expressão de CD62L, não foi observada qualquer alteração, na MIF ou na quantidade de células positivas para CD62L dos linfócitos tratados com citronelal (Figuras 13 e 14).

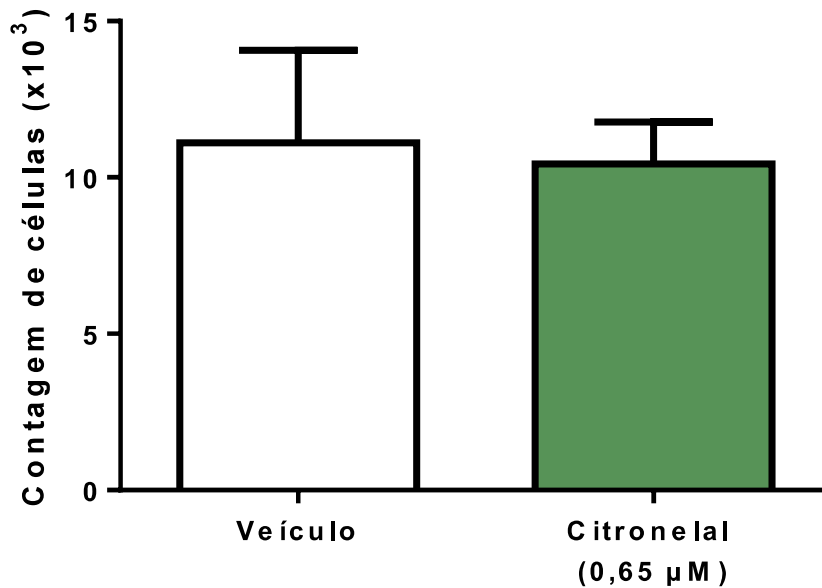
Figura 14 – Expressão média de CD62L nos linfócitos.



Fonte: Autor, 2016.

Nota: A análise da MIF do receptor CD62L não se mostrou alterada em comparação às células expostas apenas ao veículo RPMI-1640 (controle). As barras representam a média \pm EPM da viabilidade de 3 experimentos independentes.

Figura 15 – Quantitativo de linfócitos positivos para CD62L.



Fonte: Autor, 2016.

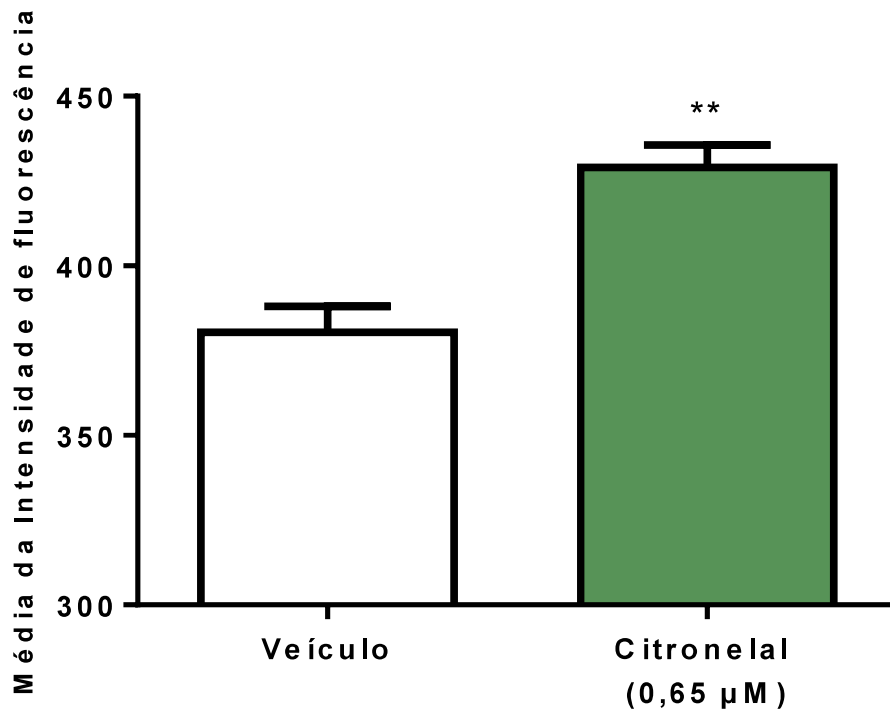
Nota: O tratamento com citronelal não alterou a quantidade de células positivas para CD62L em comparação ao grupo controle, exposto ao veículo. As barras representam a média \pm EPM da viabilidade de 3 experimentos independentes.

5.5 Actina filamentosa

A migração é um evento em que uma célula transita lançando protrusões que estão relacionadas à mudança de sua forma. Para esses prolongamentos celulares, são necessárias proteínas de citoesqueleto, e a principal é a actina filamentosa (F-actina) (ROUGERIE et al., 2013; AKHSHI et al., 2014; HOEFERT et al., 2016; RAMÍREZ-SANTIAGO, 2016).

Avaliou-se a quantidade da actina filamentosa em linfócitos tratados com citronelal, com o uso da faloidina-FITC. Foi observado um aumento de F-actina, após o tratamento com citronelal (Figura 16). Em outras palavras, este resultado demonstra o aumento da quantidade de F-actina e uma consequente redução de G-actina.

Figura 16 – Efeito do citronelal sobre o conteúdo de F-actina em linfócitos.



Fonte: Autor, 2016.

Nota: Após a exposição dos linfócitos ao citronelal por 1 h, as células foram tratadas com faloidina-FITC (1:400) por 40 minutos no escuro. Em seguida, as células foram avaliadas em citômetro de fluxo. As barras representam a média \pm EPM de 5 experimentos independentes. ** representa $p < 0,01$ em comparação as células expostas apenas ao meio RPMI-1640 (controle).

Figura 17 – Efeito do citronelal sobre a distribuição de subpopulações de linfócitos com aumento de citoesqueleto.

(Continua)

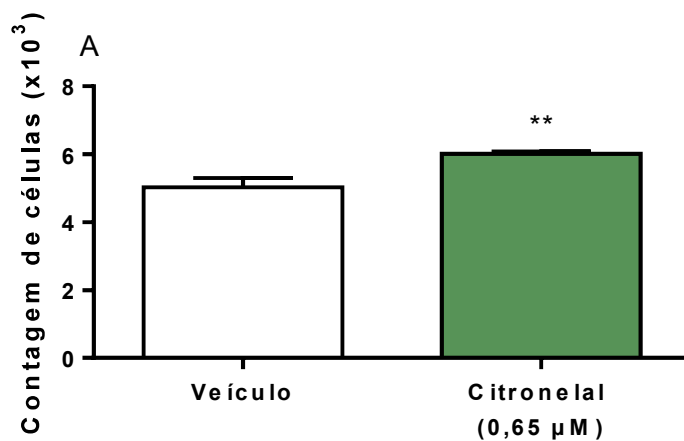
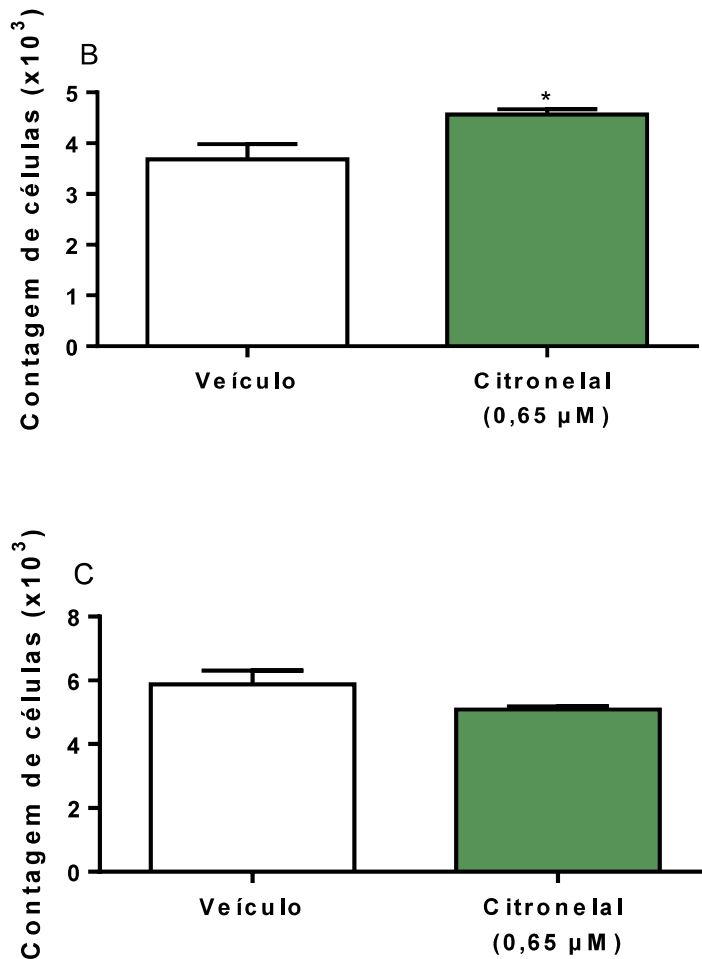


Figura 17 – Efeito do citronelal sobre a distribuição de subpopulações de linfócitos com aumento de citoesqueleto.

(Conclusão)

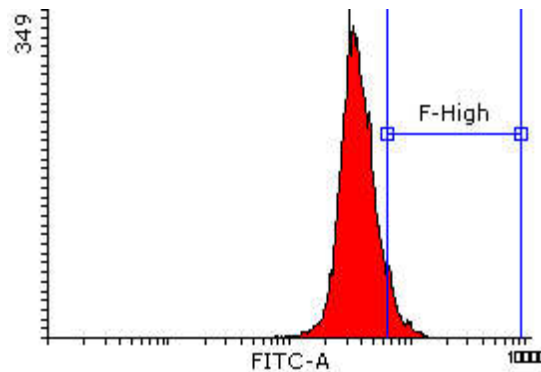


Fonte: Autor, 2016.

Nota: Os subtipos CD4 (A) e CD8 (B) demonstraram aumento significativo de frequência populacional nas células. * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$ em comparação as células expostas apenas ao meio RPMI-1640 (controle). As barras representam a média \pm EPM da viabilidade de 5 experimentos independentes.

O aumento do conteúdo de F-actina promovido pelo citronelal observado na Figura 16 esteve estatisticamente associado às subpopulações de linfócito CD4⁺ (Figura 17a) e CD8⁺ (Figura 17b), enquanto o subtipo B não apresentou diferença estatística (Figura 17c). Em outras palavras, o gráfico exhibe que os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ são as células com aumento de F-actina observado anteriormente.

Figura 18 – Conteúdo de actina filamentosa nas subpopulações de linfócitos expostos ao citronelal.



Fonte: Autor, 2016.

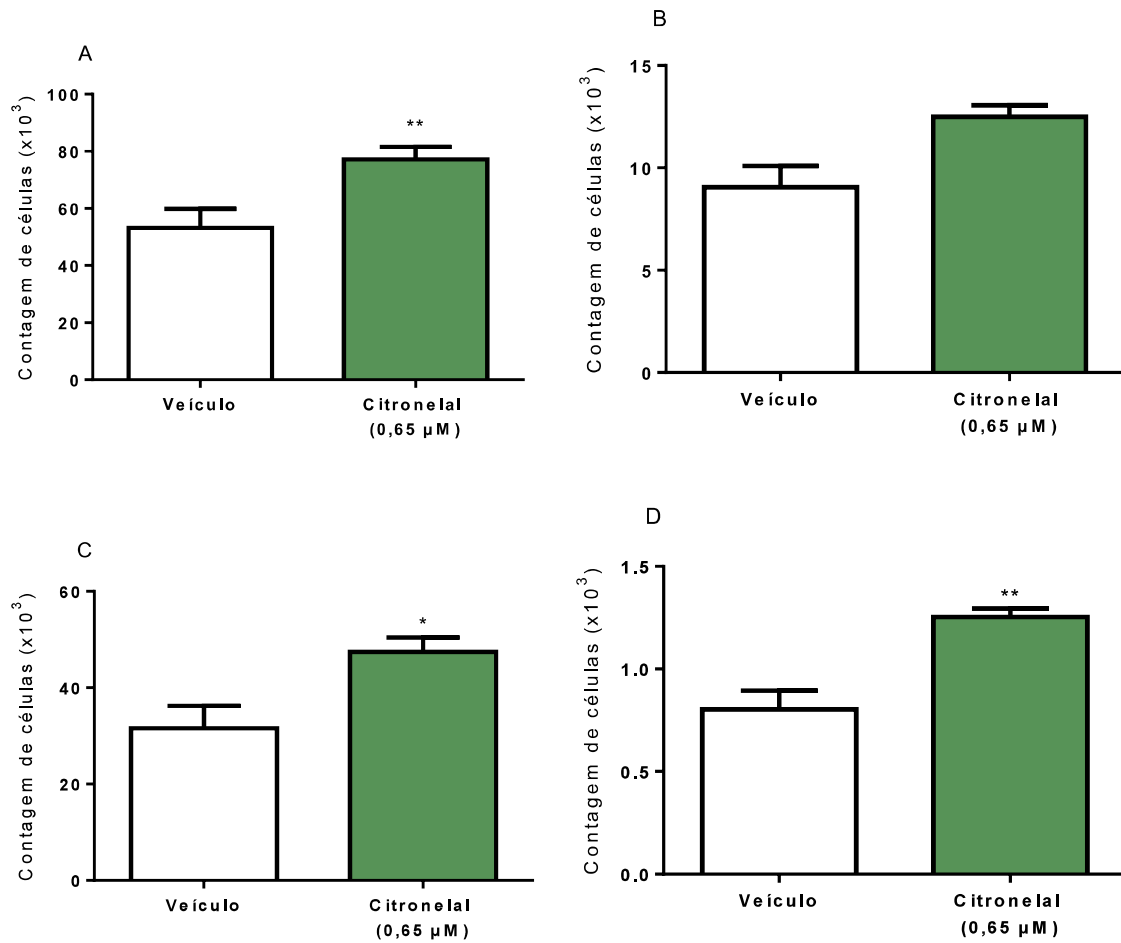
Nota: Nas análises de F-actina de linfócitos, foi observado um decaimento peculiar, próximo ao valor máximo de intensidade de fluorescência. Foi delimitada uma população neste ponto, que representou aproximadamente 5% das células analisadas, e para sua investigação, essa subpopulação foi denominada F-actina^{HIGH}.

Considerando que o filamento de actina, se for dividido em extremidade (+) (ou “farpada”), centro e extremidade (-) (ou “aguda”), apresenta maior frequência de F-actina na porção central, é possível identificar células com maior intensidade de fluorescência, denominadas F-actina^{HIGH} (ZEPEDA et al., 2014; HLUSHCHENKO; KOSKINEN; HOTULAINEN, 2016; SHEKHAR; PERNIER; CARLIER, 2016).

Para delimitar esta população F- actina^{HIGH}, foi estabelecida no histograma de intensidade de fluorescência obtido, uma *gate* próxima ao valor máximo do MIF onde estão aproximadamente 5% da população de linfócitos (Figura 18).

Uma análise na população F-actina^{HIGH} mostrou que a quantidade de linfócitos apresentando este fenótipo esteve significativamente elevada em linfócitos tratados com citronelal (Figura 19a), e a análise de subpopulações demonstrou este efeito em subtipos CD8⁺ (Figura 19c) e B220⁺ (Figura 19d), mas não em CD4⁺ (Figura 19b), assim revelando que o citronelal promoveu essa mudança característica do conteúdo de F-actina.

Figura 19 – Quantitativo de linfócitos totais ou nas subpopulações, com conteúdo aumentado de F-actina (F-actina^{HIGH}) após exposição ao citronelal.



Fonte: Autor, 2016.

Nota: Em (A), o tratamento com citronelal aumentou o número de linfócitos totais com este fenótipo; Nas subpopulações de linfócitos, não foi observado aumento significativo em linfócitos T CD4+ (B), mas houve aumento em linfócitos T CD8+ (C) e B220+ (D). Uma *gate* representativa da subpopulação F-actina^{HIGH} foi feita para obter a média de actina filamentosa de cada subpopulação, * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$ em comparação as células expostas apenas ao meio RPMI-1640 (controle). As barras representam a média \pm EPM da viabilidade de 5 experimentos independentes.

6 DISCUSSÃO

As substâncias imunossupressoras se mostram essenciais não apenas como anti-inflamatórias, mas também atuam reduzindo a rejeição de transplantes, desordens autoimunes e determinados tipos de câncer (MORELLI; LARREGINA, 2016).

Embora boa parte da literatura acerca do citronelal esteja relacionada com óleos essenciais de plantas, os dados são consideráveis pois muitas vezes o citronelal se apresenta como o componente majoritário de plantas como *Cymbopogon nardus*, *Corymbia citriodora*, *Eucalyptus citriodora* (ALTSHULER et al., 2013). Porém, ao comparar estes estudos com aqueles que usam citronelal puro, é preciso considerar que a concentração de cada componente do óleo é variável não apenas de acordo com a espécie, mas ainda pela parte da planta usada e seu estágio de desenvolvimento, técnica de extração, condições climáticas e de ecossistema (TOLBA et al., 2015; TRINDADE et al., 2015).

Nosso trabalho utilizou o citronelal puro obtido comercialmente para avaliar os efeitos desta molécula isoladamente. Os efeitos podem se mostrar diferentes dos trabalhos que utilizam óleo essencial, que neste caso apresentariam ações sinérgicas com outras substâncias presentes no óleo essencial (TRINDADE et al., 2015).

Seal e colaboradores (2012) avaliaram a viabilidade de células epiteliais A549 expostas ao vapor de extratos de óleos essenciais, e o vapor de citronelal não demonstrou toxicidade, ao contrário dos vapores de neo-isopulegol, isopulegol e citronelol. O trabalho de Batubara e colaboradores (2015), com ratos Sprague-Dawley, não encontrou alteração no ganho ou perda de massa, que são fatores básicos de indicação de toxicidade de uma substância, de modo que permite vislumbrar uma segurança quanto ao uso do citronelal.

Um trabalho de Altshuler (2013), com uso de enantiômeros isolados do citronelal, testou doses de 6.9 a 55 μM de citronelal. A escolha de doses do presente estudo foi influenciada por este trabalho, e os tempos foram avaliados com base nos resultados do teste de viabilidade.

As avaliações demonstradas neste trabalho revelam que não há redução da viabilidade de linfócitos, quando são expostos ao citronelal por uma hora (Figura 4), ao contrário de exposições mais prolongadas, como 6 horas (Figura 5) e 24 horas (Figura 6).

Estes dados serviram de parâmetro para escolha de dose e tempo de exposição seguros para o linfócito, com o intuito de explorar o potencial terapêutico que o citronelal exerceria hipoteticamente no tecido de um organismo vivo. Doses semelhantes foram testadas em células HeLa e não demonstraram toxicidade (ZORE et al., 2011).

Uma vez que a migração é um parâmetro importante para a atuação do linfócito, avaliou-se como o citronelal interfere na migração espontânea (LAFOURESSE et al., 2013; SAKAI; KOBAYASHI, 2015; RAMÍREZ-SANTIAGO, 2016).

Uma reflexão sobre a importância dos linfócitos pode ser alcançada ao levar em conta a Síndrome da imunodeficiência severa combinada (SCID), uma rara desordem genética, congênita, em que ocorre perda da imunidade de células T e B. Foi primeiramente reconhecida em humanos nos anos 1950. Bebês afetados apresentam infecções recorrentes, diarreia, e falha geral sistêmica e dificuldade de desenvolvimento. Leva à morte em até dois anos, a menos que seja feito um transplante de medula óssea com êxito (BOSMA; CARROLL, 1991).

Camundongos com SCID carecem de linfócitos T e B maduros ou funcionais, mas alguns afetados apresentam atividade normal de células NK. Os órgãos linfoides centrais e periféricos não possuem linfócitos maduros, e praticamente não há níveis séricos de imunoglobulina, e alguns podem desenvolver linfomas (BOSMA; CARROLL, 1991; FALK et al., 1995; CLAEISSON et al., 1996).

Camundongos portadores de SCID apresentaram doença inflamatória intestinal, chegando ainda a ter alguma letalidade, após receber linfócitos T CD4+ de “clones” congênicos, (que diferem em apenas um locus de um cromossomo), mas isso não foi letal quando houve a transfusão de células esplênicas sem separação (CLAEISSON et al., 2006).

A Síndrome de Omenn, condição semelhante à SCID, está associada a diferentes genótipos mutantes. Os indivíduos afetados apresentam, no primeiro ano de vida, diarreia frequente, pneumonite e prejuízo de desenvolvimento e sobrevivência, entre outras condições, ou ainda há raros indivíduos que não apresentam sintomas (PIROVANO et al., 2003; VILLA; NOTARANGELO; ROIFMAN, 2008).

Em alguns tipos de Síndrome de Omenn, há depleção de células B, com consequente prejuízo da resposta humoral e susceptibilidade a infecções. Em outros

tipos, há expansão clonal anormal de um ou mais tipos de linfócitos T. A inflamação crônica nestes pacientes se apresenta exagerada, e observa-se ausência de Linfócitos Treg e IL-10, e ainda dano tecidual por linfócitos T autorreativos. Há persistente dermatite, aliado a infecções bacterianas e fúngicas recorrentes (VILLA; NOTARANGELO; ROIFMAN, 2008).

Powrie e colaboradores (1993) investigaram a influência da injeção de subtipos de células T CD4⁺, constatando que o subtipo T CD4⁺ CD45RB^{high} foi responsável por ampliar a doença crônica inflamatória, levando ainda à morte. Já a injeção de T CD4⁺ CD45RB^{low} nas mesmas condições, conferiu um perfil protetor à colite induzida no estudo, evidenciando o caráter heterogêneo e complexo dos subtipos de linfócitos.

Em animais comuns, lipopolissacarídeos (LPS) estimulam respostas de diversas células, aumentam níveis séricos de citocinas, e levam a alterações patofisiológicas. Uma vez que animais SCID falham em responder a algumas bactérias e outras não, Falk e colaboradores (1995) avaliaram a fase inflamatória aguda nestes animais, mas foi visto que a injeção de LPS não alterou de forma relevante a inflamação na fase inicial de infecções (FALK et al., 1995), evidentemente devido ao papel do linfócito ser maior na imunidade adaptativa do que na inata.

Assim, os dados de Powrie e colaboradores (1993), Falk e colaboradores (1995), Claesson e colaboradores (2006), entre outros, indicam a complexidade e a importância da homeostase do linfócito com as demais células do órgão secundário, de modo que o linfócito atua sob constante mudança no organismo e inúmeros mecanismos de sub- e sobre-regulações, mas que certamente atuam de modo mais relevante na fase crônica da inflamação.

Os resultados deste estudo demonstraram o efeito quimiocinético do citronelal, reduzindo significativamente a migração nos principais tipos de linfócitos maduros, encontrados no linfonodo subcutâneo (Figura 7).

Este efeito se mostrou mais pronunciado em células T (3 a 4 vezes, Figura 8a e 7b) do que em células B. Este resultado se apresenta bastante relevante e de interesse, uma vez que o linfócito depende da migração para executar a maioria das suas funções no tecido inflamado. Não obstante, a célula T é conhecidamente mais relevante no processo inflamatório do que a célula B, pois produzem diversas citocinas, ativam células, entre outras funções (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

CXCL12 atua como quimioatraente, através do receptor CXCR4. Sinais quimiotáticos atuam através de seus receptores cognatos resultando em polimerização e reorganização do citoesqueleto e consequente formação de lamelipódio e uropódio celular (TAKAHAMA, 2006; FREELEY et al., 2012, LAFOURESSE et al., 2013). Condições inflamatórias levam a concentrações anormais de quimiocinas, e CXCL12 está envolvido em desordens como esclerose múltipla, bem como na capacidade metastásica de alguns tipos de câncer, e o bloqueio da interação CXCL12-CXCR4 tem sido uma das opções terapêuticas exploradas (LOMBARDI et al., 2013; GUYON, 2014; KHORRAMDELAZAD et al., 2016).

O resultado experimento demonstrou o efeito do citronelal com significativa redução da migração (Figura 7), e nas subpopulações avaliadas (Figura 8), mesmo com o uso do CXCL12 (Figura 9).

Estes achados são compatíveis com os dados de Melo e colaboradores (2011a) e Quintans-Júnior e colaboradores (2011), que, *in vivo*, observaram redução da migração leucocitária com pré-tratamento de citronelal em camundongos.

Adesão celular é um evento que precede outros eventos como invasão, migração, proliferação e, eventualmente, diferenciação (SMANIOTTO et al., 2006; CARRÉ; LACARRIÈRE, 2012). Vários tipos de células aderem e movem-se em superfícies de poliestireno, polímero utilizado em frascos e placas de cultura celular, como as utilizadas neste trabalho, e sua adesão depende de fatores do material como polaridade, carga energética livre e grupamentos químicos presentes, entre fatores presentes na célula, como a forma e plasticidade (CURTIS et al., 1983; LEE et al., 1994; CARRÉ; LACARRIÈRE, 2012). Já no começo dos anos 80, com trabalhos como o de Grinnell e Feld (1982), observava-se o efeito adjuvante da albumina, mesmo em baixas concentrações, tanto na adesão celular como na adsorção da fibronectina à superfície.

Escolhemos utilizar a albumina por servir tanto como suporte mecânico, semelhante à estrutura da matriz extracelular, como por promover o bloqueio da especificidade de ligações, promovendo a adesão por ligações inespecíficas (IWASHITA et al., 2013).

Nossos dados revelam que o citronelal foi capaz de aumentar a adesão de linfócitos (Figura 10). A análise da subpopulação revelou que, embora se possa

sugerir aumento em todos os subtipos analisados, apenas o linfócito B220⁺ (Figura 11c) alcançou um aumento significativo no número de células aderidas.

Estudar integrinas é relevante uma vez que algumas substâncias anti-inflamatórias atuam regulando a expressão ou conformação de integrinas. O VLA-4 é uma integrina que pode se ligar a moléculas de matriz para facilitar a migração de linfócitos e adesão endotelial, bem como a sinapse imunológica entre células apresentadoras de antígeno (MATSUNAGA et al., 2012; BROWN et al., 2014; MITROULIS et al., 2015; SPADARO et al., 2015). Nas avaliações deste trabalho, o citronelal não alterou a expressão média de VLA-4 por célula (Figura 13), observado pela Média de Intensidade de Fluorescência. No entanto, uma sutil redução foi observada quando foi avaliada a quantidade de células expressando o VLA-4 (Figura 14).

Sabendo que integrinas como o VLA-4 alteram sua conformação e, assim, podem se apresentar com maior ou menor afinidade dependendo do seu estado de ativação e de moléculas em contato, cabe ressaltar que a quantidade de células que expressam o VLA-4 pode ser alterada de forma significativa quando em condições diferenciadas (CARMAN; SPRINGER, 2003; MITROULIS et al., 2015).

Por outro lado, a exposição dos linfócitos ao citronelal não alterou a média da expressão de CD62L por célula (Figura 14), nem tampouco a quantidade de células apresentando este fenótipo (Figura 15), indicando que o citronelal não teve qualquer influência sobre esta molécula de superfície.

A redução de CD62L foi observada após tratamento por Natalizumab, um bloqueador de integrinas $\alpha 4$, usado no tratamento de esclerose múltipla e outras afecções, e dados experimentais de Bauer e colaboradores (2009) suportam ainda que o efeito terapêutico de bloqueadores de $\alpha 4$ no combate a doenças inflamatórias é mediado pela inibição da migração e recrutamento de células T (BAUER et al., 2009; SOLER et al., 2009; MITROULIS et al., 2015; SPADARO et al., 2015; LIEBERMAN et al., 2016).

Como foi abordado anteriormente, o evento de adesão é intrinsecamente ligado ao fenômeno da migração. Para ambos os processos, a célula necessita lançar protrusões do corpo celular, e este feito é realizado pelo citoesqueleto, onde a actina se apresenta como a principal proteína. Além disso, integrinas como VLA-4 auxiliam a ligação devido à interação do agrupamento de receptores se comunicar com moléculas de citoesqueleto como vinculina ou actinina, facilitando a formação de

pontos de adesão focal (LAFOURESSE et al., 2013; HENDESI et al., 2015; GUNNING et al., 2015; MITROULIS et al., 2015).

Além disso, modelos matemáticos prediziam a modulação da migração em decorrência da adesão, com redução da velocidade de adesão (DiMILLA; BARBEE; LAUFFENBURGER, 1991; GUPTON; WATERMAN-STORER, 2006). Com fraca adesão, a célula conta com pouca adesão focal no lamelipódio e uropódio; Em adesão demasiada forte, a contração não é suficiente para desfazer as ligações em adesões focais para continuidade do movimento (GUPTON; WATERMAN-STORER, 2006; MITROULIS et al., 2015).

Para as atividades migratórias, é necessário um dinamismo equilibrado de actina globular e filamentosa, e um desequilíbrio pode afetar o desempenho da motilidade e permeabilidade celular (XU et al., 2013). Foi analisado neste trabalho o efeito do citronelal em F-actina através da marcação com Faloidina-FITC. O tratamento com citronelal elevou significativamente a quantidade de F-actina nos linfócitos, o que pode explicar, em parte, as alterações de adesão e migração.

De fato, é observado rearranjo do citoesqueleto de actina e consequente polarização de linfócitos T quando há, por exemplo, atividade do Antígeno 1 associado à função linfocítica (LFA-1), e ativação de receptores de células T (TCR), e quimiocinas (SMITH et al., 2005; MORIN et al., 2008; LAFOURESSE et al., 2013; BROWN et al., 2014). Quimiocinas contribuem para a migração também por ativar vias de sinalização intracelular que resultam em mudanças conformacionais de receptores de integrina, que permitem adesão celular a barreiras vasculares (FREELEY et al., 2012).

A sensibilidade e importância da actina é aproveitada por alguns patógenos, como *Salmonella sp.* e alguns fungos, que induzem um rearranjo do filamento que leva a facilitar a invasão do microrganismo ou hifa na célula hospedeira. Cepas enteropatogênicas de *Escherichia coli* também atuam, mesmo extracelularmente, alterando o citoesqueleto de células para benefício próprio. Por outro lado, vários efetores e toxinas são conhecidos por induzir a resposta imune, como a ativação de NFκB, que é induzida pela despolimerização de actina. Estes e outros exemplos demonstram que alterações da dinâmica de actina promove consequências significativas (JELENSKA; KANG; GREENBERG, 2014).

Há trabalhos como o de Escribese e colaboradores (2007), em que uma alteração da dinâmica de actina foi observada e, nas mesmas condições, houve também redução da migração e da resposta inflamatória.

Uma análise imunofenotípica das células com aumento de F-actina demonstrou que este aumento esteve relacionado a subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8 (Figura 17).

A quantidade de F-actina pode ser inferida pela intensidade da fluorescência. Dentre as células com aumento de F-actina (F-actina^{HIGH}), foi realizada uma análise do conteúdo de F-actina pela MIF de cada subpopulação, onde observou-se aumento pronunciado em linfócitos T CD8 e linfócitos B (Figura 19).

No estudo de Gupton e Waterman-Storer (2006), foi considerada a relação de actina com a adesão, no entanto a alteração na adesão causaria influência na força contrátil pela ação da actina. Contudo, no nosso trabalho a F-actina se mostrou alterada independente da adesão, sugerindo uma relação de causalidade inversa, levantando sugestão de que o padrão alterado de actina acarretou em alterações na adesão.

A literatura e estudos mostram a importância da cinética de assimilação/dissimilação da actina no contexto da migração. No entanto, a dissimilação da actina se mostrou mais relevante que sua assimilação, para uma migração eficaz (GUPTON; WATERMAN-STORER, 2006), e de modo semelhante o citrônalo poderia estar afetando este processo de dissimilação, uma vez que este efeito causaria o aumento da adesão concomitante à redução da migração de linfócitos, em geral, encontrados no nosso trabalho.

A alta concentração de F-actina é observada em especializações como as espinhas dendríticas, estruturas presentes em dendritos neuronais, onde é comprovado haver um acúmulo excepcional de actina filamentosa. Neste trabalho também houve uma caracterização de uma subpopulação de acordo com a concentração de F-actina, considerando ainda que a faloidina possui um limiar mínimo de marcação, de acordo com sua concentração (CAPANI et al., 2001; HLUSHCHENKO; KOSKINEN; HOTULAINEN, 2016).

Neste estudo foi utilizada uma mistura racêmica (\pm) do citrônalo. Porém, recentemente tem-se dado atenção à ação distinta entre os enantiômeros (+) e (-) do citrônalo, sendo uma possibilidade de extensão futura deste trabalho. Altshuler e colaboradores (2013) observaram efeitos enantiosseletivos do citrônalo afetando

microtúbulos de células de planta Ref52 e células HeLa, inibindo sua polimerização. Embora se trate de células e uma molécula muito diferente, ainda é uma estrutura de citoesqueleto, e uma avaliação dos enantiômeros seria uma abordagem interessante como complemento do trabalho. Não obstante, microtúbulos interagem com actina e miosina para promover a assimetria própria da polarização celular (AKHSHI et al., 2014; HLUSHCHENKO; KOSKINEN; HOTULAINEN, 2016).

Na região central, há geração de força contrátil pela associação de miosina a filamentos de actina, gerando contração dependente de ATP. Quanto ao uropódio, ainda falta compreensão do mecanismo completo, mas sabe-se que cicla continuamente entre adesão do substrato, retração e deadesão do substrato (LAFOURESSE et al., 2013; HLUSHCHENKO; KOSKINEN; HOTULAINEN, 2016).

As proteínas da família de Cofilina/Fator despolimerizante de Actina (ADF) atuam na porção caudal do filamento de actina, despolimerizando-a (XU et al., 2013). A via de sinalização PI3K/Akt desempenha papel importante no citoesqueleto celular, permeabilidade, migração, proliferação e apoptose, de modo que investigações futuras poderiam abordar o papel desta via de sinalização e da principal proteína da família ADF/Cofilina, a Cofilina-1 (XU et al., 2013; YANG et al., 2015).

O citoesqueleto de F-actina é modulado por outras famílias de proteínas como as proteínas de ramificação (ex: complexo Arp2/3 e profilinas), de separação (ex: cofilinas), confecção (gelsolina) e de empacotamento (plastinas), e ainda as RhoGTPases como Rac1 e Rho (ESCRIBESE et al., 2007; LAFOURESSE et al., 2013; ROUGERIE et al., 2013; GUNNING, 2015), demonstrando a complexidade mecanismo de modulação.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que o citronelal possui efeito anti-inflamatório em linfócitos murinos, reduzindo a capacidade migratória, a partir da alteração da adesão celular, sendo uma importante causa, a alteração do padrão de fibras de actina.

REFERÊNCIAS

- AGRA, L. C. et al. Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 780, p. 232-242, 2016.
- AHRENS, S. et al. F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. **Immunity**, v. 36, n. 4, p. 635-645, 2012.
- AKHSHI, T. K. et al. Microtubules and actin crosstalking in cell migration and division. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 71, n. 1, p. 1-23, 2014.
- ALTSHULER, O. et al. Enantioselective Effects of (+)- and (-)-Citronellal on Animal and Plant Microtubules. **J. Nat. Prod.**, v. 76, n. 9, 1598-1604, 2013.
- AN, B. S. et al. Anti-inflammatory effects of essential oils from *Chamaecyparis obtusa* via the cyclooxygenase-2 pathway in rats. **Mol. Med. Rep.**, v. 8, n. 1, p. 255-259, 2013.
- AYRLE, H. et al. Medicinal plants – prophylactic and therapeutic options for gastrointestinal and respiratory diseases in calves and piglets? A systematic review. **BMC Vet. Res.**, v. 12, n. 89, 2016.
- BACHELERIE, F. CXCL12/CXCR4-axis dysfunctions: Markers of the rare immunodeficiency disorder WHIM syndrome. **Dis. Markers**, v. 29, n. 3-4, p. 189-198, 2010.
- BATUBARA, I. et al. Effects of inhaled citronella oil and related compounds on rat body weight and brown adipose tissue sympathetic nerve. **Nutrients**, v. 7, n. 3, p. 1859-1870, 2015.
- BAUER, M. et al. B1 integrins differentially control extravasation of inflammatory cell subsets into the CNS during autoimmunity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 106, n. 6, p. 1920-1925, 2009.
- BEREPIKI, A.; LICHIUS, A.; READ, N. D. Actin organization and dynamics in filamentous fungi. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, n. 12, p. 876-887, 2011.
- BOSMA, M. J.; CARROLL, A. M. The SCID mouse mutant: Definition, characterization, and potential uses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 323-350, 1991.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS**. Brasília, MS (Textos Básicos de Saúde), 2006a, 92.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF**. Brasília, MS (Série B. Textos Básicos de Saúde), 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria interministerial nº. 2.960**, de 9 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF, 2008.

BROWN, W. S. et al. B-Raf Regulation of Integrin $\alpha 4\beta 1$ -mediated Resistance to Shear Stress through Changes in Cell Spreading and Cytoskeletal Association in T Cells. **J. Biol. Chem.**, v. 289, n. 33, p. 23141-23153, 2014.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; JUNIOR, J. M. S. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Med. Da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008.

CAPANI, F. et al. Selective localization of high concentrations of F-actin in subpopulations of dendritic spines in rat central nervous system: a three-dimensional electron microscopic study. **J. Comp. Neurol.**, v. 435, n. 2, p. 156-170, 2001.

CARMAN, C. V.; SPRINGER, T. A. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 15, n. 5, p. 547-556, 2003.

CARRÉ, A.; LACARRIÈRE, V. How Substrate Properties Control Cell Adhesion. A Physical–Chemical Approach. **J. Adhes. Sci. Technol.**, v. 24 p. 815-830, 2012.

CHANG, J. ; KWON, H. J. Discovery of novel drug targets and their functions using phenotypic screening of natural products. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 43, n. 2-3, p. 221-231, 2016.

CHOUDHARY, D. et al. Increased expression of L-selectin (CD62L) in high-grade urothelial carcinoma: A potential marker for metastatic disease. **Urol. Oncol.**, v. 33, n. 9, p. 387:e17-27, 2015.

CLAESSON, M. H. et al. CD4+ T lymphocytes injected into severe combined immunodeficient (SCID) mice lead to an inflammatory and lethal bowel disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 104, n. 3, p. 491-500, 1996.

COAN, C. M. ; MATIAS, T. A utilização das plantas medicinais pela comunidade indígena de Ventarra Alta-RS. **SaBios : Rev. Saúde e Biol.**, v. 9, n. 1, p. 11-19, 2014.

CURTIS, A. S. et al. Adhesion of cells to polystyrene surfaces. **J. Cell Biol.**, v. 97, n. 5, p. 1500-1506, 1983.

DEB, D. et al. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. **Chem. Biol. Interact.**, v. 193, n. 1, p. 97-106, 2011.

DiMilla P.A.; BARBEE K.; LAUFFENBURGER D. A. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. **Biophys.**, v. 60, n. 1, p. 15-37, 1991.

DINARELLO, C. A.; SIMON, A.; MEER, J. W. M. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. **Nat. Rev. Drug Disc.**, v. 11, n. 8, p. 633-652, 2012.

DOGAN, I. et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. **Nature Immunol.**, v. 10, p. 1292-1299, 2009.

DÖRING, Y. et al. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. **Front. Physiol.**, v. 5, p. 212, 2014.

ESCRIBESE, M. M. et al. Mononuclear cell extravasation in an inflammatory response is abrogated by all-trans-retinoic acid through inhibiting the acquisition of an appropriate migratory phenotype. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 324, n. 2, p. 454-462, 2007.

FALK et al. LPS-inducible responses in SCID mice. **J. Endotoxin Res.**, v. 2, n. 4, p. 273-280, 1995.

FENNELL, C. W. et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, n. 2-3, p. 205-217, 2004.

FREELEY, M. et al. L-plastin regulates polarization and migration in chemokine-stimulated human T lymphocytes. **J Immunol.**, v. 188, n. 12, p. 6457-6370, 2012.

FUJITA, M. et al. The Binding of Monomeric C-Reactive Protein (mCRP) to Integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 4\beta 1$ Is Related to Its Pro-Inflammatory Action. **PLOS One**, v. 9, n. 4, e93738, 2014.

GORDON, S. Phagocytosis: An immunobiologic process. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 463-475, 2016.

GRINNELL, F.; FELD, M. K. Fibronectin Adsorption on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces Detected by Antibody Binding and Analyzed during Cell Adhesion in Serum-containing Medium. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 9, p. 4888-4893, 1982.

GUIMARÃES, A. G. et al. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol.**, v. 385, n. 3, p. 253-263, 2012.

GUIMARÃES, A. G. et al. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. **Expert Opin. Ther. Patents**, v. 24, n. 3, p. 243-265, 2014.

GUNNING, P. W. et al. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. **J. Cell. Sci.**, v. 128, n. 1, p. 2009-2019, 2015.

GUPTON, S. L.; WATERMAN-STORER, C. M. Spatiotemporal Feedback between Actomyosin and Focal-Adhesion Systems optimizes rapid cell migration. **Cell**, v. 125, n. 7, p. 1361-1374, 2006.

GUYON, A. CXCL12 chemokine and its receptors as major players in the interactions between immune and nervous systems. **Front. Cell. Neurosci.**, v. 8:65, p. 10, 2014.

HENDESI, H. et al. Integrin mediated adhesion of osteoblasts to connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) induces cytoskeleton reorganization and cell differentiation. **PLOS One**, v. 10, n. 2, p. e0115325, 2015

HLUSHCHENKO, I.; KOSKINEN, M.; HOTULAINEN, P. Dendritic Spine Actin Dynamics in Neuronal Maturation and Synaptic Plasticity. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 73, n. 9, p. 435-441, 2016.

HOEFERT, S. et al. Altered macrophagic THP-1 cell phagocytosis and migration in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). **Clin. Oral Investig.**, v. 20, n. 5, p. 1043-1054, 2016.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121 p. 860-867, 2006.

ICHII, M. et al. Early B lymphocytes development: Similarities and differences in human and mouse. 2014, **World J. Stem Cells**, v. 6, n. 4, p. 421-431, 2014.

ISHIDA, T.; TOYOTA, M.; ASAKAWA, Y. Terpenoid biotransformation in mammals. V. Metabolism of (+)-citronellal, (\pm)-7-hydroxycitronellal, citral, (-)-perillaldehyde, (-)-myrtenal, cuminaldehyde, thujone, and (\pm)-carvone in rabbits. **Xenobiotica**, v. 19, n. 8, p. 843-855, 1989.

IWASHITA, J. et al. Regulation of MUC5AC mucin production by the cell attachment dependent pathway involving integrin β 1 in NCI-H292 human lung epithelial cells. **Advances in Biological Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2013.

JELENSKA, J.; KANG, I; GREENBERG, J. T. Plant pathogenic bacteria target the actin microfilament network involved in the trafficking of disease defense components. **Bioarchitecture**, v. 4, n. 4-5, p. 149-153, 2014.

JORDAN, M. S. et al. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 4, p. 301-306, 2001.

KOBA, K. et al. *In vitro* cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. **Bangladesh J Pharmacol.**, v. 4, n. 1, p. 29-34, 2009.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

KHORRAMDELAZAD, H. et al. New insights into the role of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12) in the pathophysiology of multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.**, v. 290, p. 70-75, 2016

KPOVIESSI, S. et al. Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. **J. Ethnopharmacol.**, v. 151, n. 1, p. 652-659, 2014.

- KVIETYS, P.; GRANGER, D. N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 52, n. 3, p. 556-592, 2012.
- LEE, J. H. et al. Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups. **Biomaterials**, v. 15, n. 9p. 705-711, 1994.
- LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007.
- LIEBERMAN, L. A. CD62L is not a reliable biomarker for predicting PML risk in natalizumab-treated R-MS patients. **Neurology**, v. 86, n. 4, p. 375-381, 2016.
- LOMBARDI, L. et al. Chemokine receptor CXCR4: role in gastrointestinal cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 88, n. 3, p. 696-705, 2013.
- LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 147, n. S1, p. S232-S240, 2006.
- MAßBERG, D. et al. Monoterpene (-)-citronellal affects hepatocarcinoma cell signaling via olfactory receptor. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 566, p. 100-109, 2015.
- MARMITT, D. J. et al. Plantas Mediciniais da RENISUS Com Potencial Anti-inflamatório: Revisão Sistemática Em Três Bases de Dados Científicas. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 9, n. 2, p. 129-144, 2015.
- MATSUNAGA, T. et al. Potentiated activation of VLA-4 and VLA-5 accelerates proplatelet-like formation. **Ann. Hematol.**, v. 91, n. 10, p. 1633-1643, 2012.
- MELO, M. S. et al. Antinociceptive effect of citronellal in mice. **Pharmaceutical Biol.**, v. 48, n. 4, p. 411-416, 2010.
- MELO, M. S. et al. Anti-inflammatory and redox-protective activities of citronellal. **Biol. Res.**, v. 44, n. 4, p. 363-368., 2011a.
- MELO, M. S. et al. Bioassay-guided evaluation of central nervous system effects of citronellal in rodents. **Rev. Bras. Farmacogn.**, Curitiba, v. 21, n. 4, p. 697-703, 2011b.
- MITROULIS, I. et al. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. **Pharmacol. Ther.**, v. 147, p. 123-135, 2015.
- MO, H.; ELSON, C. E. Studies of the Isoprenoid-Mediated Inhibition of Mevalonate Synthesis Applied to Cancer Chemotherapy and Chemoprevention. **Exp. Biol. Med.**, v. 229, n. 7, p. 567-585, 2004.
- MORELLI, A. E.; LARREGINA, A. T. Concise Review: Mechanisms Behind Apoptotic Cell-Based Therapies Against Transplant Rejection and Graft versus Host Disease. **Stem Cells**, v. 34, n. 5, p. 1142-1150, 2016.

MORIN, N. A. et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates integrin LFA-1 de-adhesion during T lymphocyte migration. **J. Exp. Med.**, v. 205, n. 1, p. 195-205, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MULYANINGSIH, S. et al. Antibacterial activity of essential oils from Eucalyptus and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharm. Biol.**, v. 49, n. 9, p.893-899, 2011.

NICOLAOU, K. C. et al. Constructing molecular complexity and diversity: total synthesis of natural products of biological and medicinal importance. **Chem. Soc. Rev.**, v. 7, n. 41, p. 5185-5238, 2012.

OLIVEIRA, W. A. et al. Antifungal activity of cymbopogon winterianus jowitt ex bor against *Candida albicans*. **Brazilian J. Microbiol.**, v. 42, n. 2, p. 433-441, 2011a.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 13, n. 1, p.8-16, 2011b.

OSADA, K. et al. Citronellal ingestion decreases the appeal of male mouse urinary pheromone for female mice. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 76, n. 9, p. 1781-1784, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Selected medicinal plants** – volume 1. Geneva: WHO, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Medicina tradicional: potencial e necessidades crescentes. **Policy perspectives on medicines**, Genebra, n. 2, p. 1-6, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The top 10 causes of death: The 10 leading causes of death in the world 2012.** 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The top 10 causes of death: The 10 leading causes of death in the world 2015.** 2017.

PATRA, B. et al. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 11, p. 1236-1247, 2013.

PIROVANO, S. et al. Impaired thymic output and restricted T-cell repertoire in two infants with immunodeficiency and early-onset generalized dermatitis. **Immunol. Letters**, v. 86, p. 93-97, 2003.

PRESA, N. et al. Regulation of cell migration and inflammation by ceramide 1-phosphate. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1861, n. 5, p. 402-409, 2016.

POWRIE, F. et al. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. **Int. Immunol.**, v. 5, n. 11, p. 1461-1471, 1993.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p.619-624, 2008.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Antinociceptive effects of citronellal in Formalin-, Capsaicin-, and Glutamate-Induced Orofacial Nociception in Rodents and Its Action on Nerve Excitability. **J. Orofac. Pain**, v.24, p. 305-312, 2010.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Antinociceptive action and redox properties of citronellal, an essential oil present in lemongrass. **J. Med. Food.**, v. 14, n. 6, p. 630-639, 2011.

RAMÍREZ-SANTIAGO, G. et al. Clathrin regulates lymphocyte migration by driving actin accumulation at the cellular leading edge. **Eur. J. Immunol.**, v. 46, n. 9, 2016.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

RIVELINE, D. et al. Synthetic polyamines: new compounds specific to actin dynamics for mammalian cell and fission yeast. **Bioarchitecture**, v. 4, n. 4-5, p. 144-148, 2014.

ROBERTS, E. S. et al. Catalysis by cytochrome P-450 of an oxidative reaction in xenobiotic aldehyde metabolism: deformylation with olefin formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 20, p.8963-8966, 1991.

ROUGERIE, P. et al. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton. **Immunol. Rev.**, v. 256, n. 1, p. 222-239, 2013.

SAFARZADEH, E.; SHOTORBANI, S. S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. **Adv. Pharm. Bulletin**, v. 4, p. 421, 427, 2014.

SAKAI, Y.; KOBAYASHI, M. Lymphocyte 'homing' and chronic inflammation. **Pathol. Int.**, v. 65, n. 7, p. 344-354, 2015.

SANTANA, M. F. et al. The anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles of *p*-cymene: Evidence for the involvement of opioid system and cytokines. **Pharm. Biol.**, v. 53, n. 11, p. 1583-1590, 2015.

SCHETT, G. Review: Immune cells and mediators of inflammatory arthritis. **Autoimmunity**, v. 41, n. 3, p. 224-229, 2008.

SEAL, S. et al. Vapor of volatile oils from *Litsea cubeba* seed induces apoptosis and causes cell cycle arrest in lung cancer cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47014, 2012.

SEGUIN, L. et al. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. **Trends Cell Biol.**, v. 25, n. 4, p. 234-240, 2015.

- SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature**, v. 8, n. 5, p. 349-361, 2008.
- SHAWAHNA, R.; JARADAT, N. A. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by patients with psoriasis in the West Bank of Palestine. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 3, n. 1, 2017.
- SHEKHAR, S.; PERNIER, J.; CARLIER, M. Regulators of actin filament barbed ends at a glance. **J. Cell Sci.**, v. 129, n. 6, p. 1085-1091, 2016.
- SILVA, M. R. et al. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. **Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.**, v. 381, p. 415-426, 2010.
- SKIRYCZ, A. et al. Medicinal Bioprospecting of the Amazon Rainforest: A Modern Eldorado? **Trends Biotechnol.**, v. 34, n. 10, p. 781-790, 2016.
- SMANIOTTO, S. et al. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. **Endocrinology**, v. 146, n. 7, p. 3005-3017, 2005.
- SMITH, A. et al. A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. **J. Cell Biol.**, v. 170, n. 1, p. 141-151, 2005.
- SOLER, D. et al. The binding specificity and selective antagonism of vedolizumab, an anti- $\alpha 4\beta 7$ integrin therapeutic antibody in development for inflammatory bowel diseases. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 330, n. 3, p. 864-875, 2009.
- SOLOMON, B. et al. Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and in vitro permeation studies. **Eur. J. Pharm and Biopharm.**, v. 80, p. 61-66, 2012.
- SONGKRO, S. et al. Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with β -cyclodextrin for mosquito repellent. **J Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, v. 72, p. 339-355, 2012.
- SPADARO, M. et al. Natalizumab treatment reduces L-selectin (CD62L) in CD4+ T cells. **J. Neuroinflammation**, v. 12, p. 146, 2015.
- SPONCHIADO, G. et al. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **J. Ethnopharmacol.**, v. 3, n. 178, p. 289-296, 2016.
- STOLZ, E. D. et al. Survey of plants popularly used for pain relief in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 185-196, 2014.
- TAKAHAMA, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 127-136, 2006.
- TOLBA, H. et al. Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antifungal activity. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, p. e128-e133, 2015.

TRINDADE, L. A. et al. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. **Clin. Oral Invest.**, v. 19, p. 2223-2231, 2015.

VALENÇA, M. M.; Da SILVA, A. A.; BORDINI, C. A. Headache research and medical practice in Brazil: an historical overview. **Headache**, v. 55, n. S1, p. 4-31, 2015.

VILLA; NOTARANGELO; ROIFMAN, C. M. Omenn syndrome: inflammation in leaky severe combined immunodeficiency. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 122, n. 6, p. 1082-1086, 2008.

WEI, L. S.; WEE, W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. **Iranian J. Microbiol.**, v. 5, n. 2, p. 147-152, 2013.

WONG, C. K. et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 125, n. 2, p. 177-183, 2001.

XU, H. et al. Paeoniflorin attenuates Lipopolysaccharide-induced permeability of endothelial cells: involvements of F-actin expression and phosphorylations of PI3K/Akt and PKC. **Inflammation**, v. 36, n. 1, p. 216-225, 2013.



YANG, L. et al. Cannabinoid receptor CB2 is involved in tetrahydrocannabinol-induced anti-inflammation against lipopolysaccharide in MG-63 cells. **Mediators Inflamm.**, v. 2015, p. 362126, 2015.

YERUVA, L. et al. Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 257, p. 216-226, 2007.

ZEPEDA, I. et al. Visualization of highly dynamic F-actin plus ends in growing phaseolus vulgaris root hair cells and their responses to *Rhizobium etli* nod factors. **Plant Cell Physiol.**, v. 55, n. 3, p. 580-592, 2014.

ZORE, G. B. et al. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomed.**, v. 18, p. 1181-1190, 2011.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió – AL, 08/03/2010

Senhor (a) Pesquisador (a), Salete Smaniotto

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 08/03/2010 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 028370/2010-07 sob o título, **Estudo dos efeitos do hormônio do crescimento sobre o sistema imune: uma abordagem neuroimunoendócrina** vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

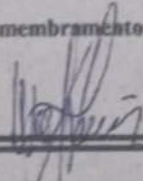
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido. (*) Áreas temáticas especiais

Projetos de PIBIC, com planos de trabalho e projetos de mestrado que sejam desmembramentos desse protocolo, deverão ser avaliados em novos Protocolos de Pesquisa.



Dr. Dr. Walter Matias Lima
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa