



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

DÉBORA DOS SANTOS DIAS

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES IMUNOMODULATÓRIAS DO EXTRATO BRUTO
HIDROALCÓLICO DAS PARTES AÉREAS DE *Baccharis dracunculifolia* DC.
(ASTERACEAE)**

**JUIZ DE FORA – MINAS GERAIS
2016**

DÉBORA DOS SANTOS DIAS

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES IMUNOMODULATÓRIAS DO EXTRATO BRUTO
HIDROALCÓLICO DAS PARTES AÉREAS DE *Baccharis dracunculifolia* DC.
(ASTERACEAE)**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa

Co-orientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

JUIZ DE FORA – MINAS GERAIS

2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Dias, Débora dos Santos.

ESTUDO DAS PROPRIEDADES IMUNOMODULATÓRIAS DO EXTRATO BRUTO HIDROALCÓLICO DAS PARTES AÉREAS DE *Baccharis dracunculifolia* DC. (ASTERACEAE) / Débora dos Santos Dias. -- 2016.

65 p.

Orientador: José Otávio do Amaral Correa

Coorientador: Ademar Alves da Silva Filho

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

1. Bioprospecção de produtos naturais. 2. Imunomodulação. I. Correa, José Otávio do Amaral, orient. II. Filho, Ademar Alves da Silva, coorient. III. Título.

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES IMUNOMODULATÓRIAS DO
EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DAS PARTES AÉREAS
DE *Baccharis dracunculifolia* DC. (ASTERACEAE)**

Débora dos Santos Dias

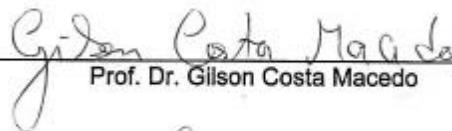
Prof. Dr. José Otávio do Amaral Correa

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 20/07/2016



Prof. Dr. Rômulo Augusto de Abreu Franchini



Prof. Dr. Gilson Costa Macedo



Prof. Dr. José Otávio do Amaral Correa

AGRADECIMENTOS:

Mais uma etapa se finda, e mais do que nunca é necessário agradecer!

À Deus, pela oportunidade e por me nortear durante esse caminho.

Aos meus pais pela força diária durante essa caminhada e pelo amor reconfortante.

À família, pelo apoio e por compartilhar das dificuldades e conquistas.

Ao NIPPAN Team, pelo aprendizado, e por tornarem cada momento melhor. Vocês estarão para sempre no meu coração!

À Poli, por ser o “colo” em todas as dificuldades e também o motivo para tantas risadas! Amo você, Poli.

À Loh, por ter embarcado comigo literalmente numa viagem no meio do caminho!
Amo você também, Loh!

A todos os amigos que de alguma forma me acompanharam nesse processo. Vocês foram essenciais, e sabem disso!

Aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia pelos ensinamentos e pela acolhida.

À CENTRALBIO pela utilização dos equipamentos.

Ao LIDIPO por disponibilizar o laboratório, os equipamentos, a copa, as mestrandas, doutorandas e ICs. Gabi, você foi show! Obrigada pela colaboração e amizade!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela possibilidade de realização desse projeto.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

Ao Prof. Gilson, pelo aprendizado imensurável, e por tornar esse processo tão leve.

Ao Prof. Ademar, por ser co-orientador, amigo, pai, irmão e psicólogo, quando necessário. Por me incentivar em todos os momentos e por ter sempre uma pergunta pras minhas respostas!

Ao Prof. José Otávio, pela compreensão, incentivo, motivação, preocupação, por todo o apoio, e por ter me aberto as portas para a pesquisa científica! Obrigada pela confiança!

“Nada é impossível para aquele que persiste”

RESUMO

Introdução: As plantas tem sido alvo de diversos estudos devido ao seu potencial terapêutico, uma vez que elas produzem metabólitos secundários bioativos. A espécie *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae), popularmente conhecida como “alecrim do campo” ou “vassoura” é uma espécie vegetal nativa do Brasil, que tem sido reconhecida como a principal fonte botânica da própolis verde, e é utilizada na medicina popular como anti-inflamatória. O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades imunomodulatórias do extrato bruto hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* frente à produção de mediadores da resposta imune, bem como seus possíveis mecanismos em cultura de macrófagos peritoneais e esplenócitos.

Metodologia: Folhas de *B. dracunculifolia* foram coletadas e foi produzido seu extrato bruto hidroalcoólico (E-Bd) (etanol: água 8:2, v/v) que foi posteriormente analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para os ensaios biológicos foram utilizados camundongos C57Bl/6. Foi avaliada a citotoxicidade em macrófagos e esplenócitos pelo método do MTT. Para o ensaio de proliferação de esplenócitos também foi utilizado o método do MTT. A produção de NO foi realizada em cultura de macrófagos peritoneais e esplenócitos pelo método de Griess e a expressão de MHC II, CD40, CD80 e CD86 em cultura de macrófagos peritoneais por citometria de fluxo. O ensaio de produção de IL-12 foi realizado por ELISA.

Resultados: Foram obtidos 120g do extrato bruto hidroalcoólico E-Bd. De acordo com o ensaio de citotoxicidade, o extrato E-Bd não foi citotóxico nos tipos celulares avaliados em concentrações de até 100 µg/mL. A proliferação de esplenócitos foi inibida. O extrato em questão foi capaz de reduzir os níveis de NO tanto em cultura de macrófagos peritoneais quanto em cultura de esplenócitos. Pela citometria de fluxo, foi possível observar que o extrato E-Bd foi capaz de reduzir a expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 e ainda de CD40, não promovendo a redução da expressão de MHC II. A produção de IL-12 também foi reduzida na presença do extrato.

Conclusão: Os resultados obtidos sugerem o potencial do extrato E-Bd em modular as respostas imunológicas.

Palavras-chave: Produtos naturais, *Baccharis dracunculifolia*, imunomodulação, citocinas.

ABSTRACT

Introduction: Plant species have been target of studies due to their therapeutical potential, since they produce bioactive secondary metabolites. *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) has been recognized as the main source of Brazilian green propolis and is popularly known as “alecrim do campo” or “vassoura”. It is used in Brazilian folk medicine as anti-inflammatory. This study aimed to evaluate the immunomodulatory properties of the crude hydroalcoholic extract of *B. dracunculifolia* on the production of immune mediators, and its mechanisms in peritoneal macrophages and splenocytes.

Methods: The leaves from *B. dracunculifolia* were collected and the extract was obtained with ethanol: water (8:2, v/v). The extract was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). For biological assays C57Bl/6 mice were utilized. Cytotoxicity was evaluated both in macrophages and splenocytes using MTT method. Proliferation of splenocytes assay was also performed by MTT. Peritoneal macrophages and splenocytes from C57Bl/6 mice were cultured for NO production, which was performed by Griess method and CD80, CD86, CD40 and MHC II expression analysis were evaluated in macrophages culture by flow cytometry. The cytokine (IL-12) production assay was performed by ELISA.

Results: 120g of the crude extract E-Bd were obtained and it was not cytotoxic on macrophages and splenocytes culture in concentrations up to 100 µg/mL. The proliferation of splenocytes was inhibited. E-Bd extract was able to reduce NO levels on both cell cultures. Results obtained by flow cytometry indicated that E-Bd reduced the expression of CD80 and CD86 co-stimulatory molecules and also CD40 but not of MHC II. Furthermore, IL-12 production was also reduced in the presence of E-Bd extract.

Conclusion: The presented results suggest that E-Bd can modulate immune responses.

Key-words: Natural products, *Baccharis dracunculifolia*, immunomodulation, cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - Ácido 2,2-diazino etilbenzotialino sulfônico

AME – Aromadendrina-4'-metil éter

APC – Célula Apresentadora de Antígeno (Antigen Presenting Cell)

BSA – Albumina de soro bovino (Bovine Serum Albumin)

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CD – Grupo de diferenciação (Cluster of differentiation)

CFA – Adjuvante Completo de Freund (Complete Freund Adjuvant)

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLV – Cromatografia Líquida à Vácuo

ConA – Concanavalina A

COX-2 – Ciclo-oxigenase 2

DCM – Diclorometano

DMSO - Dimetilsulfóxido

E-Bd – Extrato hidroalcoólico bruto de *Baccharis dracunculifolia*

eNOS – Óxido nítrico sintetase endotelial (ou NOS III)

ERK – Quinases extracelulares reguladas por sinal (Extracellular signal-regulated kinases)

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

IFN- γ – Interferon-gama

IL – Interleucina

IL-1R – Receptores de Interleucina-1 (IL-1 Receptors)

iNOS – Óxido Nítrico Sintetase induzível (ou NOS II)

JNK – Quinase c-Jun NH₂-terminal

LPS – Lipopolissacarídeo

LRR – Domínio de Repetição Rico em Leucina (Leucine-rich Repeat)

MAPK – Proteínas quinases ativadas por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases)

MeOH – Metanol

MFI – Média de Intensidade de Fluorescência (Mean of Fluorescence Intensity)

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade II (Major Histocompatibility Complex II)

MPO – Mieloperoxidase

MTT – Microcultura com tetrazólio (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio)

NF- κ B – Fator nuclear- κ B (Nuclear Factor- κ B)

NK – *Natural Killer*

nNOS – Óxido nítrico sintetase neuronal (ou NOS I)

PAMP – Padrão moléculas associado a patógeno (Pathogen-associated Molecular Pattern)

PBS – Tampão fosfato (Phosphate Buffer Saline)

PE – Ficoeritrina (Phycoerythrin)

PGE2 – Prostaglandina E2

PRR – Receptores de Reconhecimento de Padrões (Pattern recognition receptors)

TCR – Receptor de células T (T Cell Receptor)

TGF- β – Fator transformador de crescimento-beta (Transforming-growth factor- β)

T_h – Células T auxiliares (T helper)

TIR – Domínio IL-1R dos receptores do tipo Toll (Toll IL-1R domain)

TLR – Toll-like Receptor

T_{reg} – Células T regulatórias

TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa

TNF- β – Fator de necrose tumoral-beta

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.	Translocação do NF- κ B após ativação de receptor do tipo Toll (TLR-4)	18
Figura 2.	Indução da expressão de iNOS e produção de óxido nítrico em resposta a estímulos imunogênicos	19
Figura 3.	Diferenciação das células T CD4 ⁺ nas suas principais subpopulações	21
Figura 4.	Moléculas coestimuladoras e seus receptores presentes nas células T auxiliares e APCs	22
Figura 5.	Abelhas <i>Apis mellifera</i> coletando o material resinoso das partes aéreas de <i>B. dracunculifolia</i>	26
Figura 6.	Partes aéreas da espécie <i>Baccharis dracunculifolia</i>	33
Figura 7.	Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de <i>B. dracunculifolia</i>	41
Figura 8.	Espectros de ultravioleta dos principais picos apresentados no cromatograma obtido após análise por CLAE do extrato E-Bd	43
Figura 9.	Viabilidade de macrófagos peritoneais (%) após incubação com diferentes concentrações (100,50 e 25 μ g/mL) do extrato E-Bd.....	44
Figura 10.	Viabilidade de esplenócitos (%) após incubação com diferentes concentrações (100,50 e 25 μ g/mL) do extrato E-Bd	45
Figura 11.	Índice de proliferação de esplenócitos (%) em 72h após o estímulo com ConA e os tratamentos com E-Bd em três concentrações (100, 50 e 25 μ g/ml).....	46
Figura 12.	Produção de óxido nítrico na presença de diferentes concentrações (100, 50 e 25 μ g/mL) de E-Bd	47
Figura 13.	Produção de IL-12 na presença do extrato E-Bd (100, 50 e 25 μ g/mL) por macrófagos peritoneais após estímulo (LPS e IFN- γ)	49
Figura 14.	Efeitos do extrato E-Bd nas concentrações de 100 e 50 μ g/mL na expressão de A) CD80, B) CD86, C) CD40 e D) MHC II, na presença de estímulos (LPS e IFN- γ)	50
Figura 15.	Mecanismo de ação do Abatacepte e seus efeitos supressores da resposta imunológica	52
Tabela 1.	Principais constituintes já identificados em extratos de <i>B. dracunculifolia</i>	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 O sistema imunológico	16
2.2 Inflamação e autoimunidade	22
2.3 O gênero <i>Baccharis</i> e a espécie <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	24
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	33
4.2 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	34
4.3 Animais de experimentação	34
4.4 Obtenção e cultura de células	35
4.5 Ensaio de citotoxicidade e proliferação de esplenócitos	36
4.5.1 Ensaio de citotoxicidade	36
4.5.2 Ensaio de proliferação de esplenócitos	37
4.6 Avaliação dos efeitos imunomodulatórios do extrato e compostos isolados	37
4.6.1 Produção de óxido nítrico	37
4.6.2 Produção de IL-12	38
4.6.3 Expressão de moléculas co-estimuladoras	39
4.7 Análises estatísticas	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

As espécies vegetais e, principalmente, suas propriedades terapêuticas têm sido alvo de pesquisas em todo o mundo uma vez que esta biodiversidade afeta a vida do homem de diversas maneiras e seu uso na medicina popular data desde a antiguidade. Os estudos das espécies vegetais se tornaram possíveis, devido principalmente, ao desenvolvimento alcançado nas áreas de fitoquímica e química medicinal (VALLI et al., 2012).

As plantas são capazes de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários que exercem um papel essencial na sobrevivência das espécies e no equilíbrio ambiental. Na natureza estes compostos atuam nas interações planta-planta e planta-insetos, exercendo, entre outras funções, a de proteger as espécies de pragas e doenças, representando, portanto, um importante recurso para o desenho e desenvolvimento de novos fármacos (VALLI et al., 2012; AJAIYEOBA et al., 2013).

Diversas plantas possuem atividade imunomoduladora, isto é, apresentam capacidade de suprimir ou estimular componentes do sistema imunológico envolvidos em respostas celulares e/ou humorais, uma vez que este sistema age de forma integrada. Embora a atividade imunomoduladora de muitas espécies já seja conhecida, pouco se sabe a respeito dos mecanismos pelos quais estas plantas exercem tais efeitos (MAJDALAWIEH, FAYYAD, 2015)

O sistema imunológico dos vertebrados atua através de respostas complementares, pró e anti-inflamatórias que ocorrem a partir de eventos celulares e moleculares regulados por redes de forma a manter uma homeostase dinâmica essencial para seu bom funcionamento. Sua principal função é prover ao organismo defesa contra patógenos e tumores, de forma que uma imunossupressão torna o indivíduo mais susceptível a estes. Por outro lado, sua superativação está envolvida em diversas desordens como nas doenças autoimunes, no choque anafilático e nos processos alérgicos e inflamatórios crônicos (GERTSCH, VIVEROS-PAREDES, TAYLOR, 2011).

As doenças mediadas pelo sistema imune são atualmente tratadas com anti-inflamatórios não-esteroidais, e fármacos que modulam as respostas imunes, através de imunossupressão ou imunestimulação. Os imunossupressores são utilizados para reduzir a resposta imunológica em transplantes e doenças autoimunes, entre os mais utilizados estão os glicocorticoides, como a prednisona, também conhecidos como anti-inflamatórios esteroidais. Já os imunostimuladores são utilizados em imunodeficiências, infecções ou em alguns tipos de câncer, como é o caso dos *interferons* (GILMAN, 2001; RANG et al., 2007).

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são agrupados em diversas classes e mais de 50 fármacos diferentes estão atualmente no mercado. Embora eles promovam um efeito anti-inflamatório seu uso torna-se limitado uma vez que com frequência levam a efeitos adversos importantes como lesões gástricas. A toxicidade dos AINEs, glicocorticoides e imunomoduladores despertam o interesse em produtos naturais que podem apresentar eficácia, segurança e com menor custo (RANG et al., 2007; LIU et al., 2015).

Nesse contexto, diferentes espécies vegetais tem sido avaliadas em relação ao seu potencial para essa finalidade. Bachiega e colaboradores (2013) demonstraram o efeito imunomodulatório do extrato bruto de *Baccharis dracunculifolia*, uma espécie vegetal pertencente ao gênero *Baccharis* (Asteraceae) conhecida popularmente como alecrim do campo. Neste trabalho, foi avaliado também o efeito de um de seus principais constituintes, o ácido caféico, o qual já é reconhecido como um inibidor da resposta imune (BACHIEGA et al., 2013).

O gênero *Baccharis* possui mais de 500 espécies distribuídas no continente americano e tem sido alvo de estudos devido às propriedades farmacológicas descritas para suas espécies. A espécie *Baccharis dracunculifolia* DC. (de Candolle) ocorre na América do Sul, do sudeste do Brasil até a Argentina e o Uruguai e é utilizada na medicina popular como hepatoprotetora, gastroprotetora e anti-inflamatória (GUIMARÃES et al., 2012; BACHIEGA et al., 2013; REZENDE et al., 2014).

Esta espécie é a principal fonte botânica da própolis brasileira dos estados de Minas Gerais e São Paulo, conhecida como própolis verde por sua coloração. A

própolis é um material resinoso, produzido pelas abelhas (*Apis mellifera*) a partir da coleta de exsudatos em brotos de plantas, e é utilizada nas colmeias para reparar danos, e também para proteção, devido principalmente à sua atividade antimicrobiana (SIMÕES et al., 2004; REZENDE et al., 2014).

Dos Santos e colaboradores (2009) observaram que o extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *B. dracunculifolia* foi capaz de reduzir a dor e a inflamação agudas induzidas por diferentes substâncias, e ainda o edema de pata induzido por carragenina em camundongos, além de inibir a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2). Outro estudo demonstrou que o extrato de folhas de *B. dracunculifolia* é capaz de reduzir a produção de IL-6 e IL-10 por macrófagos também de camundongos, antes e depois de estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) (DOS SANTOS et al., 2009; BACHIEGA et al., 2013).

Devido ao uso medicinal da própolis, a qual é produzida a partir do conteúdo coletado das partes aéreas de *B. dracunculifolia*, do uso da própria espécie na medicina popular por suas propriedades imunomodulatória e anti-inflamatória, e do pequeno número de estudos em relação à espécie frente ao sistema imunológico, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato bruto hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* na produção de mediadores da resposta imunológica e seus possíveis mecanismos *in vitro*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O sistema imunológico

A principal função do sistema imunológico é prover proteção contra infecções e/ou processos patológicos que venham a agredir o organismo, e este sistema vem sendo dividido conceitualmente em sistema imune inato e adaptativo. A imunidade inata é caracterizada por uma resposta rápida a um grande, porém limitado, número de estímulos. Já a imunidade adaptativa é uma resposta mais tardia e com maior especificidade, podendo ser do tipo celular ou humoral, ocorrendo nesta a produção de anticorpos (CRUVINEL et al., 2010; GERTSCH et al., 2011).

A imunidade inata, ou natural é representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas como os macrófagos, células dendríticas e células *natural killer* (células NK) e moléculas solúveis como as proteínas circulantes do sistema complemento, presentes em qualquer indivíduo mesmo antes de contato com algum antígeno, e responsáveis por coordenar muitos dos processos envolvidos nas respostas imunológicas. Já a imunidade adaptativa, ou adquirida é composta por células T e B efectoras e seus produtos secretados, sendo estas ativadas após processamento e apresentação antigênica por células da imunidade inata chamadas de células apresentadoras de antígenos (APCs), representadas, por exemplo, pelos macrófagos e células dendríticas (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012; CRUVINEL et al., 2010; GERTSCH et al., 2011).

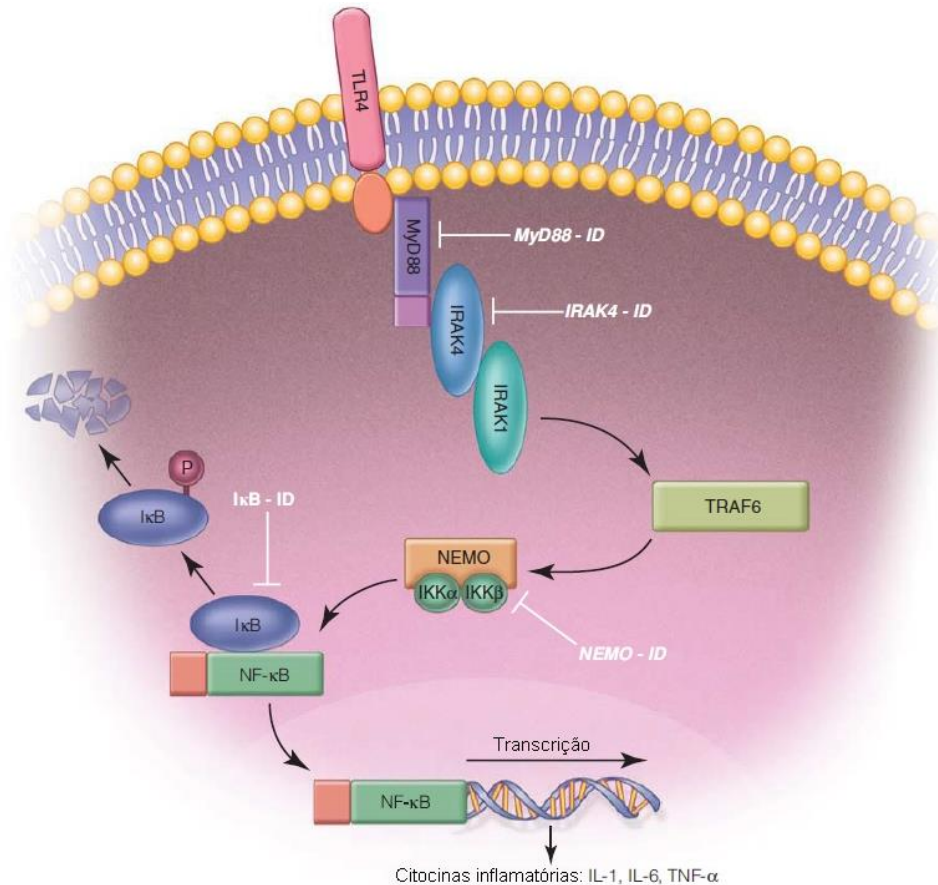
A primeira linha de defesa celular do organismo contra patógenos é representada pela imunidade inata e é mediada, principalmente, por neutrófilos e macrófagos sendo que estes exercem um importante papel por serem células responsáveis pela destruição de patógenos e células tumorais de forma direta através da fagocitose, ou indireta através da produção de mediadores como óxido nítrico (NO) e citocinas, sendo as principais o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a interleucina-1 β (IL-1 β), além de prostaglandina E2 (PGE2). A produção

excessiva destes mediadores, entre outros fatores, resulta em desordens inflamatórias e/ou injúrias teciduais sendo necessária a ação de agentes supressores (AZIKE et al., 2011; KANG et al., 2011).

Além da fagocitose e liberação de mediadores inflamatórios a imunidade inata atua ainda através das proteínas do sistema complemento e síntese de proteínas de fase aguda e quimiocinas. Todos esses mecanismos são desencadeados pelo reconhecimento de regiões do antígeno conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que funcionam como estímulo. Estas são reconhecidas pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), sendo os principais os do tipo Toll (TLRs) (CRUVINEL et al., 2010).

A família dos receptores do tipo Toll possui 13 membros já identificados em mamíferos sendo os mais bem caracterizados o TLR-2 e o TLR-4, responsáveis por reconhecer componentes de bactérias e fungos, e LPS respectivamente. Os TLRs são proteínas transmembranas com uma região extracelular que contém resíduos de repetição ricos em leucina (LRRs), e uma região intracelular ou citoplasmática, que pertence à superfamília dos receptores de interleucina-1 (IL-1Rs) chamado de domínio Toll IL-1R (TIR), responsável por mediar a interação desses receptores, com proteínas que irão propagar a cascata que levará à resposta imunológica (TAKEUCHI, AKIRA, 2010; DEGUINE, BARTON, 2014).

A ativação dos TLRs pelos seus ligantes pode levar à ativação de duas vias. A proteína adaptadora Myd88 é a principal responsável pela ativação destas vias que promovem a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Uma delas ocorre através da fosforilação da proteína I κ B, responsável por manter o fator nuclear- κ B (NF- κ B) inativo no citoplasma. Sua fosforilação leva à liberação do NF- κ B que é translocado para o núcleo ativando a expressão dos genes dessas citocinas (Figura 1). Através da indução à síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 o NF- κ B exerce um importante papel nas respostas inflamatórias agudas, além de participar da sobrevivência celular (LI et al., 2013; DEGUINE, BARTON, 2014).



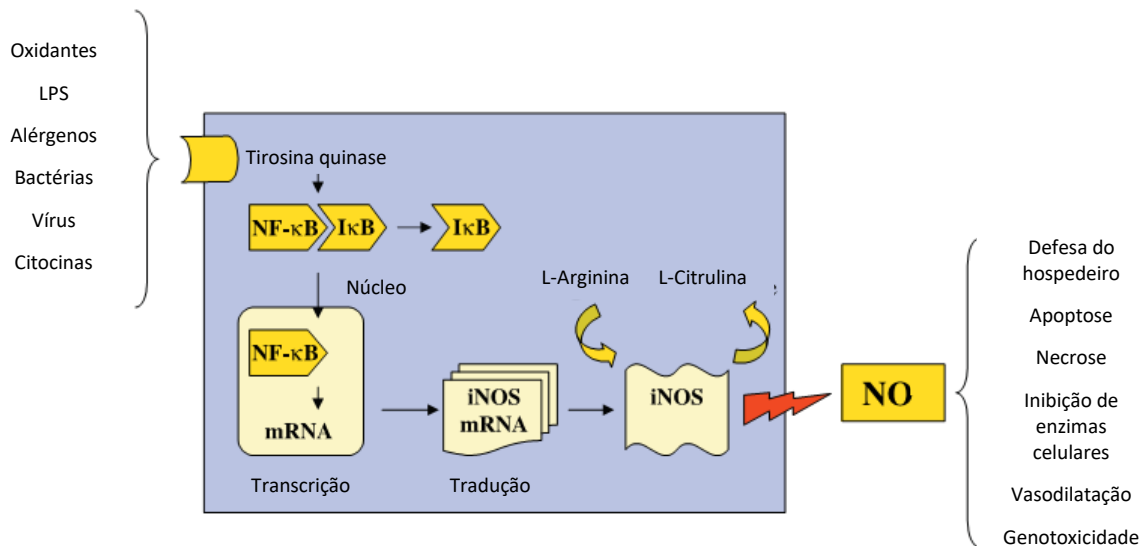
Fonte: JYONOUCHI, SULLIVAN, 2013

Figura 1. Translocação do NF-κB após ativação de receptor do tipo Toll (TLR-4)

Outra via de sinalização ativada pelos receptores Toll e que promove a produção de citocinas pró-inflamatórias e também de NO é caracterizada pela fosforilação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). As MAPKs são um grupo de proteínas sinalizadoras que consiste nas quinases extracelulares reguladas por sinal (ERKs), na proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38MAPK) e na quinase c-Jun NH₂-terminal (JNK). Estas tem importante papel na inflamação, no crescimento e diferenciação celular, bem como na resposta celular à citocinas e ao estresse (LI et al., 2013).

O óxido nítrico é produzido a partir da enzima óxido nítrico sintetase que está presente em diferentes tipos celulares do organismo nas suas isoformas denominadas eNOS, nNOS e iNOS. As duas primeiras são isoformas expressas constitutivamente, enquanto a terceira é uma isoforma induzida após os estímulos

inflamatórios (Figura 2). Este mediador, além de estar envolvido no processo inflamatório, possui importantes propriedades fisiológicas (HOBBS, HIGGS, MONCADA, 1999; LEE, GOLD, LINKER, 2012).



Fonte: Adaptada de RICCIARDOLO et al., 2004

Figura 2. Indução da expressão de iNOS e produção de óxido nítrico em resposta a estímulos imunogênicos

A imunidade inata, além de prover a resposta inicial ao organismo, é ainda responsável pela ativação da imunidade adaptativa. A ativação dos linfócitos requer a presença do estímulo, e a presença de algumas substâncias produzidas pela resposta inata. A presença do antígeno garante a especificidade da resposta, e o ambiente químico criado pelas substâncias, assegura que essa resposta só seja desencadeada em situações reais de risco ao organismo, e não quando forem reconhecidos antígenos inofensivos, ou até mesmo antígenos próprios (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

As respostas imunes adaptativas são normalmente iniciadas nos órgãos linfoides periféricos, como nos linfonodos a partir da apresentação do antígeno às células T pelas APCs. As células T virgens, ou seja, células que nunca tiveram contato com o antígeno podem ser, principalmente, de duas classes de acordo com a expressão das moléculas co-receptoras CD4 ou CD8 juntamente ao receptor de

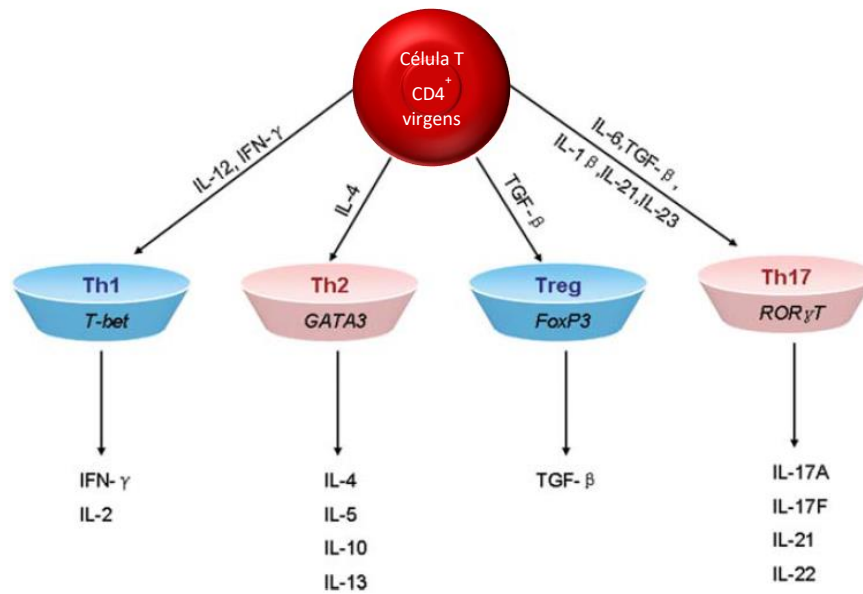
células T (TCR). As células que expressam a molécula CD8, chamadas de células T CD8⁺, se diferenciam em células T citotóxicas efectoras, e aquelas que expressam a molécula CD4, chamadas células T CD4⁺ ou células T auxiliares, podem se diferenciar em diferentes subpopulações, sendo as principais as células T helper 1 (T_{h1}), T helper 2 (T_{h2}), T helper 17 (T_{h17}) e T regulatórias (T_{reg}) (Figura 3) (MURPHY, TRAVERS, WALPORT, 2010; ICHIYAMA et al., 2011).

A diferenciação nos subtipos celulares T_{h1}, T_{h2}, T_{h17} e T_{reg}, ocorre, entre outros fatores, dependendo do antígeno apresentado, e do microambiente de citocinas formado durante a ativação das células T, e estes subtipos celulares promovem diferentes tipos de resposta através da liberação de citocinas que atuam como mediadores imunológicos (MESQUITA-JUNIOR et al., 2010; COPE et al., 2011; ICHIYAMA et al., 2011).

A diferenciação em células T_{h1} requer o fator de transcrição T-bet e essas células são secretoras de interferon-gama (IFN- γ) e TNF- α/β , principais mediadores da resposta do tipo celular contra os patógenos intracelulares. Já as células T_{h2} expressam o fator de transcrição GATA-3 e secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, interleucinas mediadoras da resposta do tipo humoral, voltada aos patógenos extracelulares. (ICHIYAMA et al., 2011; KU, LIN, 2013).

Uma outra subpopulação de células T CD4⁺, mais recentemente descoberta, é a de células T_{h17}. Estas células dependem do fator de transcrição ROR γ T para sua diferenciação, que ocorre na presença de fator transformador de crescimento-beta (TGF- β) e IL-6, e são secretoras de IL-17, IL-21 e IL-23. A IL-17 tem importante papel nas doenças autoimunes, na eliminação de patógenos extracelulares e no câncer, enquanto que as interleucinas IL-21, e IL-23 estão relacionadas à manutenção do subtipo celular T_{h17} (ICHIYAMA et al., 2011; JI et al., 2014).

As células T regulatórias (T_{reg}) que exercem importante papel na regulação de respostas imunológicas, e na autotolerância, expressam o fator de transcrição FoxP3 e são produtoras de citocinas supressoras como IL-4, IL-10 e TGF- β . A atuação dessas células garante a modulação das respostas mesmo na presença do estímulo, seja ele um antígeno infeccioso, um tumor, ou um autoantígeno (MESQUITA-JUNIOR et al., 2010).

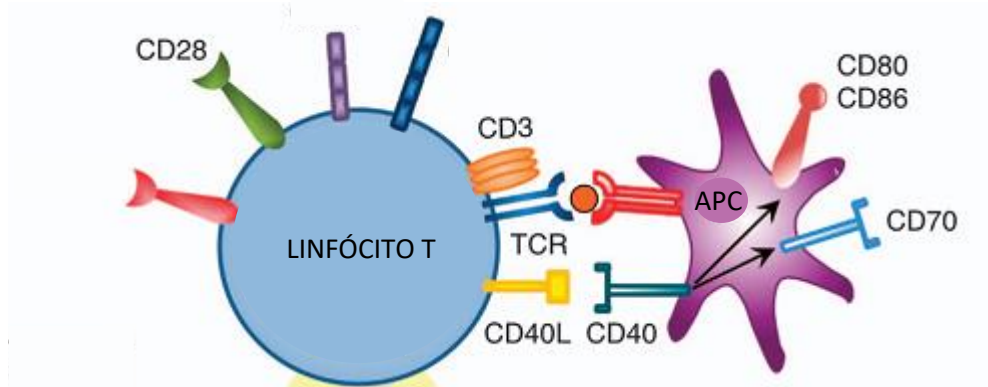


Fonte: Adaptada de WANG et al., 2013

Figura 3. Diferenciação das células T CD4⁺ em suas principais subpopulações

Enquanto as citocinas presentes durante a ativação direcionam a diferenciação das células T auxiliares, moléculas co-estimuladoras atuam mantendo a ativação induzida pelo estímulo ao TCR, a divisão e expansão dessas células, e, dessa forma regulam não só a magnitude das respostas, mas também suas características (COQUET, RAUSCH, BORST, 2015).

Duas importantes moléculas coestimuladoras presentes nas APCs são chamadas de CD80 e CD86. Estas moléculas se ligam ao receptor CD28 presente nas células T de modo que a cascata intracelular desencadeada pela apresentação antigênica é amplificada, otimizando a resposta destas células. Ainda, a molécula CD40L presente nas células T, interage com o receptor CD40 nas APCs aumentando a expressão de CD80 e CD86, e permitindo então, em conjunto ou não com os sinais oriundos dos PRRs, o reconhecimento do antígeno e o desenvolvimento da resposta específica (Figura 4). Dessa forma, tais moléculas se tornam um alvo interessante para modulação das respostas imunológicas (COQUET, RAUSCH, BORST, 2015).



Fonte: Adaptada de COQUET, RAUSCH, BORST, 2015

Figura 4. Moléculas coestimuladoras e seus receptores presentes nas células T auxiliares e APCs

2.2 Inflamação e Autoimunidade

A inflamação é um mecanismo de defesa do corpo classificado como parte da imunidade inata, mas que se prolonga e se torna mais refinada durante a resposta imune adaptativa. Ela é desencadeada pelo reconhecimento de antígenos ou injúria tecidual, e seu primeiro sinal é o edema que ocorre devido ao recrutamento de leucócitos e proteínas plasmáticas do sangue para os tecidos, seguido de elevação da temperatura e rubor locais além de promover dor local, devido à presença de neuromediadores produzidos através de cascatas complexas desencadeadas pela injúria tecidual. Estes ativam nociceptores, levando à ocorrência da transmissão dolorosa (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012; LI et al., 2013; SILVA et al., 2013).

Quando um processo infeccioso ou de injúria tecidual se prolonga, o processo inflamatório torna-se crônico e promove uma intensa destruição tecidual. Neste processo, estímulos da imunidade inata contribuem, mas é a resposta adaptativa desencadeada por citocinas produzidas pelas células T que mantém este processo

devido à sua grande capacidade indutora de inflamação (COPE et al., 2011; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

A imunidade inata atua na inflamação principalmente através dos macrófagos, que são responsáveis pela fagocitose e produção de mediadores inflamatórios que são capazes de potencializar a resposta, além de ativar a imunidade adaptativa. O óxido nítrico, e as citocinas TNF- α e IL-6 são exemplos destes mediadores que atuam no processo inflamatório (SILVA, et al., 2013).

O componente da imunidade adaptativa na inflamação se dá pela atuação das células T CD4⁺. Suas subpopulações precisam estar sempre em equilíbrio visando garantir a resposta adequada, e o retorno à homeostase do sistema. As células T_{h1} e T_{h2} mantêm um balanço imunológico no hospedeiro, de forma que, quando desregulado, pode provocar doenças autoimunes, como *diabetes mellitus* tipo 1 e artrite reumatoide se houver excesso de produtos secretados pelas células T_{h1}, e intensos processos alérgicos quando os produtos secretórios em excesso forem provenientes de células T_{h2}. Sendo assim, a regulação e manutenção do equilíbrio T_{h1}/T_{h2} é essencial para a prevenção de tais desordens (KU, LIN, 2013).

Considera-se importante, ainda, o balanço imunológico T_{h17}/ T_{reg}. Ji e colaboradores (2014) demonstraram que o desequilíbrio entre essas duas respostas, com aumento de células T_{h17} ou redução das células T_{reg} está associado com um quadro moderado a grave de asma destacando o papel dessas células na patologia dessa doença, bem como de outras desordens autoimunes, como esclerose múltipla, doença de Chron, entre outras (JI et al., 2014).

As doenças inflamatórias crônicas mediadas por células T são progressivas e possuem uma elevada taxa de morbi/mortalidade. São, na maioria dos casos, mediadas pelos subtipos celulares T_{h1} e T_{h17} e as terapias disponíveis são limitadas, pois, alguns pacientes apresentam uma resposta inadequada ou sub-ótima, além de fortes efeitos adversos (COPE et al. 2011; ROCHA-JUNIOR et al., 2013).

Estes tratamentos são geralmente realizados com o uso de corticoides que a longo prazo podem levar à hiperglicemias com indução ao diabetes, osteoporose, e atrofia muscular. Também são utilizados os imunossupressores, que comumente

são responsáveis pelo aumento da predisposição a infecções e tumores, devido a imunossupressão excessiva e inespecífica. Dessa forma, fármacos que atuem especificamente nas vias e respostas desreguladas podem trazer benefícios à farmacoterapia atualmente realizada (BISAGA et al., 2012).

Tendo em vista que o sistema imunológico, apesar de sua função de prover proteção ao organismo, pode causar também danos ao mesmo a partir de respostas desreguladas, inadequadas ou exacerbadas, e que os tratamentos atualmente utilizados possuem restrições principalmente devido aos efeitos adversos importantes que provocam nos pacientes, as buscas por novos medicamentos que possam modular as respostas imunes tem ganhado destaque, a fim de se desenvolver novas opções terapêuticas para os indivíduos que necessitam deste tipo de tratamento.

2.3 O gênero *Baccharis* e a espécie *Baccharis dracunculifolia* DC.

Atualmente, um dos principais objetivos no estudo de plantas medicinais é a descoberta de novos compostos bioativos com potencial para o desenvolvimento de fármacos. Neste contexto, o gênero *Baccharis*, o mais numeroso da família Asteraceae, apresentando mais de 500 espécies distribuídas principalmente nas zonas de clima temperado do continente americano, tem sido uma importante fonte de produtos naturais medicinais (ABAD, BERMEJO, 2007).

Cerca de 120 espécies ocorrem no Brasil, em sua maioria na região sudeste, e a grande quantidade de espécies nas áreas elevadas do Brasil e dos andes, sugerem a possibilidade de uma destas localidades ser a origem deste gênero. As espécies do gênero *Baccharis* são geralmente arbustos de 0,5 a 4 metros de altura e apresentam elevado valor sócioeconômico, uma vez que são utilizadas na medicina popular, principalmente na forma de chá, para o tratamento de diversas doenças, como úlceras, doenças hepáticas, processos inflamatórios, infecções bacterianas e

fúngicas, além de serem utilizadas em feridas, como diurético e analgésico (BUDEL et al., 2005; VERDI, BRIGHENTE, PIZZOLATTI, 2005; ABAD, BERMEJO, 2007).

Os compostos que se destacam no gênero são os flavonoides, os diterpenos clerodanos e labdanos, tri e sesquiterpenos, fenilpropanoides e derivados do ácido cumárico. Entre as espécies mais estudadas do gênero quanto à composição química e/ou atividades biológicas está a *B. dracunculifolia* DC. que é popularmente conhecida como alecrim-do-campo ou vassoura. Trata-se de uma espécie nativa brasileira ocorrendo nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, principalmente nas áreas de cerrado (VERDI, BRIGHENTE, PIZZOLATTI, 2005; SFORCIN et al., 2012).

Esta espécie é a principal fonte vegetal da própolis brasileira dos estados de Minas Gerais e São Paulo, conhecida como própolis verde por sua coloração proveniente da clorofila presente no vegetal. As abelhas *Apis mellifera* fragmentam brotos e folhas jovens de *B. dracunculifolia* com seu primeiro par de patas, coletando a resina destas folhas e então transferindo-a para sua corbícula, onde na colmeia, serão adicionadas cera e secreções salivares a fim de produzir a própolis verde (Figura 5) (SFORCIN et al., 2012).



Fonte: BELMIRO, OKI, FERNANDES, 2011.

Figura 5. Abelhas *Apis mellifera* coletando o material resinoso das partes aéreas de *B. dracunculifolia*.

Própolis é uma palavra de origem grega, na qual “pro” significa em defesa, e “polis” comunidade. Este material resinoso é utilizado pelas abelhas na construção de suas colmeias para protegê-la da entrada de invasores, além de ser utilizada para embalsamar insetos mortos dentro da colmeia. Devido às suas propriedades antimicrobianas, a própolis é também utilizada na colmeia para proteção contra bactérias, fungos e vírus. Atualmente, tem sido utilizada no Brasil em bebidas e alimentos devido às suas atividades biológicas a fim de melhorar a saúde e prevenir doenças, além de conferir a estes seu aroma (DA SILVA FILHO et al., 2007; FAROOQUI, FAROOQUI, 2010).

Sugere-se que a interação entre a *Apis mellifera* e a *B. dracunculifolia* se dá principalmente devido ao fato de esta espécie produzir óleos caracterizados por possuírem um aroma forte e exótico reconhecido pelas abelhas, que tem alta capacidade olfatória. Além disso, as folhas de *B. dracunculifolia* possuem tricomas tectores e glandulares que auxiliam nessa interação, além de protegerem as folhas do ataque de predadores através da intensa produção de metabólitos secundários que ocorre durante o desenvolvimento do vegetal (SFORCIN et al., 2012).

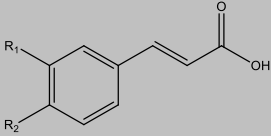
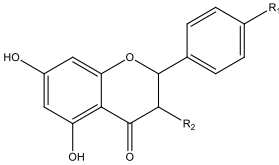
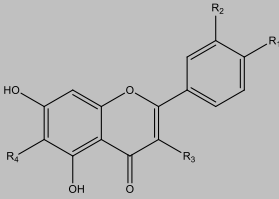
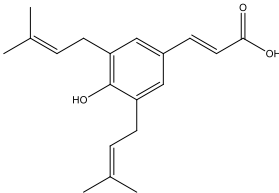
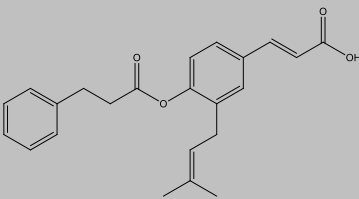
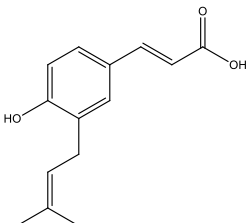
Seus tricomas secretores são ricos nestes metabólitos secundários que apresentam variações sazonais mais quantitativas do que qualitativas, mas que podem afetar as propriedades medicinais da espécie. Figueiredo-Rinhel e colaboradores (2013) demonstraram variações na capacidade de inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por neutrófilos humanos, de extratos de *B. dracunculifolia* produzidos por material vegetal coletado mensalmente durante um ano. Todos os extratos foram ativos, porém, uma maior atividade foi encontrada nos extratos com maior teor de ácido cafeico (1) (Tabela 1), sugerindo que este constituinte pode ser utilizado como marcador para a atividade biológica da espécie (DE SOUZA et al., 2011; FIGUEIREDO-RINHEL et al. 2013).

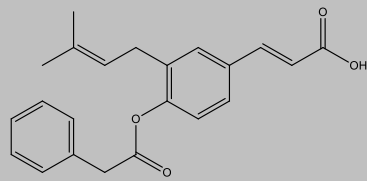
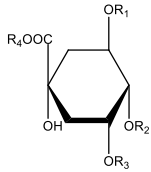
Park e colaboradores (2004) verificaram a presença em extratos de brotos e folhas jovens de *B. dracunculifolia* de flavonoides como crisina (11), canferol (10), isosacuranetina (5), canferido (9) e acacetina (8), além dos ácidos cumárico (3), ferúlico (4), cinâmico (2) e do fenilpropanoide artepilina C (13) (Tabela 1), sendo este o constituinte majoritário nestas amostras (PARK, et al., 2004)

A artepilina C (13) já havia sido descrita na espécie em outros estudos, juntamente com os demais fenilpropanoides bacarina (14) e drupanina (15), além dos flavonoides isosacuranetina (5), acacetina (8), aromadendrina-4'-metil éter (AME) (6) e naringenina (7), do derivado do ácido *p*-cumárico, ácido (*E*)-3-prenil-4-(diidrocinamoiloxi)-cinâmico (16) e dos ácidos 4,5-dicafeoilquínico (17) e 3,4-dicafeoilquínico (18) (Tabela 1) (NAGATANI, WARASHINA, NORO, 2001; NAGATANI, WARASHINA, NORO, 2002a; NAGATANI, WARASHINA, NORO, 2002b; KUMAZAWA, et al., 2003).

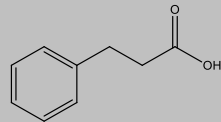
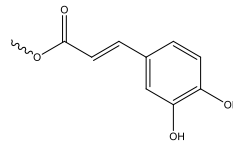
Em um estudo que avaliou a atividade tripanocida de *B. dracunculifolia*, da Silva Filho e colaboradores (2004) identificaram no lavado das folhas os compostos já citados isosacuranetina (5), AME (6), ácido ferúlico (4), ácido (*E*)-3-prenil-4-(diidrocinamoiloxi)-cinâmico (16), e ainda os compostos ácido diidrocinâmico (19), óxido de baccharis (20) e friedelanol (21). Em um outro estudo do mesmo autor estudo foram identificados no extrato bruto de *B. dracunculifolia* os constituintes ácido ursólico (22), ácido 2 α -hidroxi ursólico (23), uvaol (24), ermanina (12), viscidona (25), entre outros (Tabela 1) (DA SILVA FILHO et al. 2004; DA SILVA FILHO et al., 2009).

Tabela 1. Principais constituintes já identificados em extratos de *Baccharis dracunculifolia*.

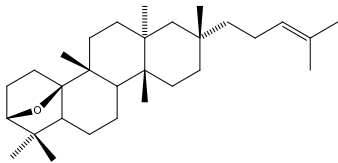
ESTRUTURA	SUBSTÂNCIA
	1) Ácido caféico: $R_1, R_2 = OH$ 2) Ácido cinâmico: $R_1, R_2 = H$ 3) Ácido cumárico: $R_1 = H, R_2 = OH$ 4) Ácido ferúlico: $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$
	5) Isosacuranetina: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$ 6) AME: $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$ 7) Naringenina: $R_1 = OH, R_2 = H$
	8) Acacetina: $R_1 = OCH_3, R_2, R_3, R_4 = H$ 9) Canferido: $R_1 = OCH_3, R_2, R_4 = H, R_3 = OH$ 10) Canferol: $R_1, R_3 = OH, R_2, R_4 = H$ 11) Crisina: $R_1, R_2, R_3, R_4 = H$ 12) Ermanina: $R_1, R_3 = OCH_3, R_2, R_4 = H$
	13) Artepilina C
	14) Bacarina
	15) Drupanina

16) (*E*)-3-prenil-4-(diidrocinaoiloxi)-cinâmico17) Ácido 4,5-dicafeoilquínico: $R_1, R_2 = \text{cafeoil}$,
 $R_3, R_4 = \text{H}$ 18) Ácido 3,4-dicafeoilquínico: $R_1, R_4 = \text{H}$, $R_2,$
 $R_3 = \text{cafeoil}$

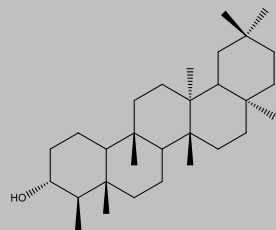
Cafeoil =



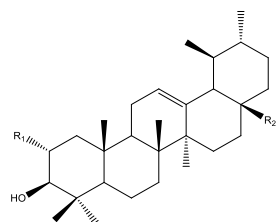
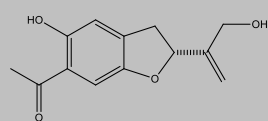
19) Ácido diidrocinaâmico



20) Óxido de baccharis



21) Friedelanol

22) Ácido ursólico: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{COOH}$ 23) Ácido 2 α -ursólico: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{COOH}$ 24) Uvaol: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$ 

25) Viscidona

B. dracunculifolia é amplamente utilizada na medicina popular, na forma de chá devido às suas atividades antiúlcera, imunomodulatória e anti-inflamatória, além de estudos já terem relatado seus efeitos como antimicrobiana, antiviral e tripanocida, e a maioria das suas atividades tem sido relacionada à presença dos derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, principalmente artepilina C (12) e bacarina (13), embora suas atividades imunomodulatória e antioxidante já tenham sido relacionadas também ao ácido caféico (1) e aos seus principais flavonoides, como isosacuranetina (5) e AME (6) (Tabela 1). (RESENDE et al., 2012; FIGUEIREDO-RINHEL et al., 2013; BACHIEGA et al., 2013; REZENDE et al., 2014).

Dos Santos e colaboradores (2009) relataram as atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *B. dracunculifolia* em diferentes modelos de dor e inflamação como indução de contrações abdominais com ácido acético, glutamato e adjuvante completo de Freund (CFA), edema e dor inflamatória induzida por carragenina, além de capacidade de inibir a atividade da enzima COX-2, altamente expressa em processos inflamatórios (DOS SANTOS et al., 2009).

Em um estudo que avaliou a atividade de extratos de *B. dracunculifolia* e alguns de seus compostos isolados sobre macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c foi demonstrado que o extrato e o lavado de folhas, bem como o extrato da raiz, e os constituintes óxido de baccharis e friedelanol aumentaram a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por estas células, sugerindo a atividade modulatória das amostras avaliadas sobre um tipo celular do sistema imunológico. Ainda, Figueiredo-Rinhel e colaboradores (2013), em seu estudo já citado, mostraram que extratos de folhas de *B. dracunculifolia* inibem a geração de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos humanos, através da metodologia de quimioluminescência, reforçando a atividade da espécie sobre estes mediadores (MISSIMA et al., 2007; FIGUEIREDO-RINHEL et al., 2013).

Bachiega e colaboradores (2013) avaliaram os efeitos do extrato de folhas de *B. dracunculifolia* e do ácido caféico, seu principal constituinte, frente à produção de citocinas inflamatórias por macrófagos peritoneais murinos e observaram que tanto o extrato, quanto o ácido caféico, estimularam a produção de IL-1 β , mas inibiram a produção de IL-6 e IL-10 em células não estimuladas. Em células estimuladas com

LPS, o extrato foi capaz de reduzir as concentrações de IL-6 e IL-10, antes ou após a adição do estímulo, enquanto o ácido caféico foi capaz de reduzir a concentração de IL-6 antes ou após o estímulo, mas de IL-10 apenas quando adicionado após o estímulo (BACHIEGA et al., 2013).

O extrato bruto de *B. dracunculifolia* foi ainda avaliado em modelo de colite aguda e crônica, induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico, sendo capaz de reduzir a atividade de mieloperoxidase (MPO), além de inibir a peroxidação lipídica e a depleção de glutathiona, efeitos que permitiram a redução dos danos causados à mucosa intestinal que ocorrem nesta doença devido ao intenso processo oxidativo mediado por neutrófilos, sendo a atividade de MPO considerada um importante marcador para avaliação de atividade anti-inflamatória de extratos e compostos (CESTARI, BASTOS, DI STASI, 2011).

Apesar de estudos já terem relatado a atividade imunomodulatória/anti-inflamatória de extratos e constituintes de *B. dracunculifolia*, a falta de resultados conclusivos em relação à atividade dessa espécie frente ao sistema imune, além da falta de estudos em relação às vias ou mecanismos pelos quais os efeitos observados podem estar sendo desencadeados sugere que são necessários novos estudos a fim de se investigar e aprofundar essas propriedades.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico bruto das partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia* frente à produção de mediadores das respostas imunológicas e seus possíveis mecanismos *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

1. Produzir o extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia*;
2. Submeter o extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia* à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
3. Avaliar a citotoxicidade do extrato em macrófagos peritoneais e esplenócitos;
4. Investigar o efeito do extrato na produção de mediadores da resposta imune inata (NO e IL-12), por macrófagos peritoneais;
5. Propor possíveis mecanismos para os efeitos observados através de ensaios de proliferação de esplenócitos e expressão das moléculas CD40, CD80, CD86 e MHC II por macrófagos peritoneais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia*

Partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia* foram coletadas no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) em janeiro de 2013. A exsicata encontra-se depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, sob número 47.482.



Fonte: Arquivo da autora

Figura 6. Partes aéreas da espécie *Baccharis dracunculifolia*.

As partes aéreas foram secas à temperatura ambiente e trituradas com auxílio de moinho de facas resultando em 500g de material vegetal pulverizado. O pó resultante foi submetido ao processo de maceração com solução hidroalcoólica (8:2 v/v) (Etanol P. A. Vetec) por um período de 3 dias. A solução hidroalcoólica foi filtrada em papel de filtro e concentrada com auxílio de um rotaevaporador (Buchi® RII), com pressão reduzida (bomba Buchi® V-700) e banho à 50°C. Após estes

procedimentos foram obtidos 120 g de extrato bruto hidroalcoólico de partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia* (E-Bd).

4.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

O extrato bruto hidroalcoólico E-Bd foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência, no laboratório CentralBio (Faculdade de Farmácia, UFJF), em coluna analítica de fase reversa (Sun Fire™ C18; 4,6 x 250 mm; 5 µm), na presença de pré-coluna (Sun Fire™ C18; 4,6 x 20 mm; 5 µm), empregando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Waters) composto por duas bombas (modelo 1525), injetor automático (modelo 2707) e detector de arranjo de diodos (modelo 2998). Para estas análises foi utilizado um sistema gradiente linear que foi constituído pela seguinte fase móvel: H₃PO₄ em água até pH = 3 (A) e metanol (MeOH) (Alphatec) (B), variando de 20 a 95% de B (0 - 77 min), com fluxo de fase móvel a 0,8 mL/min. A aquisição de dados foi obtida a partir do *software* Empower 3 Waters Corporation, no qual a partir da varredura realizada foi selecionada a leitura em 290 nm (GUIMARÃES et al., 2012).

4.3 Animais de experimentação

Foram utilizadas fêmeas de 8-12 semanas de camundongos C57Bl/6 provenientes do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF. Os animais foram aclimatizados no biotério do Laboratório de Imunologia, Doenças infecto-parasitárias e Obesidade (LIDIPO) do ICB-UFJF e todos os procedimentos realizados estão de acordo com o preconizado pelo Código Brasileiro para Utilização

de Animais de Laboratório, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFJF, sob número de protocolo 041/2013.

4.4 Obtenção e cultura de células

Os macrófagos foram induzidos por injeção intraperitoneal de 2mL de tioglicolato 3% e após 3 dias os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical (GORDON, UNKELESS e COHN, 1974). A obtenção das células ocorreu da seguinte maneira:

Macrófagos peritoneais: foi feita a assepsia da região abdominal dos animais e então a pele foi removida para exposição da cavidade abdominal. Em seguida, foram injetados 5 mL de tampão fosfato PBS (phosphate buffer saline, pH = 7,4) resfriado estéril na cavidade abdominal e após massagear o abdômen para desprendimento das células da membrana peritoneal, o lavado celular foi coletado e transferido para tubos cônicos do tipo Falcon de 15mL estéreis.

As suspensões de células foram centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos, em centrífuga refrigerada (4°C), e após descartados os sobrenadantes, os botões celulares foram ressuspensos com 2mL de RPMI 1640 completo (estreptomicina 50 µg/mL, penicilina 50 U/mL, aminoácidos não essenciais 1% e soro fetal bovino 5%) (GIBCO). Para contagem das células, fez-se a diluição da suspensão de células em azul de Tripán (Sigma) na proporção de 1:50, e posteriormente foi feito o ajuste do número de células para os ensaios.

Esplenócitos: após coleta do lavado peritoneal, a membrana da cavidade abdominal foi aberta para retirada dos baços. Estes foram triturados com o auxílio de peneiras de aço estéreis e então centrifugados a 4°C, e 1500 rpm por 10 minutos. Após descartados os sobrenadantes, os botões celulares foram ressuspensos em tampão de hemólise (cloreto de amônio 0,8% em água; pH = 7,35) para lise de

eritrócitos, e centrifugados novamente a 4°C e 1500 rpm, repetindo-se esse processo até lise completa das hemácias.

Após lise completa das hemácias, as células foram então ressuspensas em 2 mL de RPMI 1640 completo fazendo-se então a diluição em azul de Tripán para contagem em câmara de Neubauer e posterior ajuste do número de células para os ensaios.

4.5 Ensaios de citotoxicidade e proliferação de esplenócitos

4.5.1 Ensaio de citotoxicidade

O teste de viabilidade celular foi realizado com as células peritoneais e esplenócitos utilizando a conversão do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT, Invitrogen), de cor amarelada, a um composto de coloração púrpura, o formazan. Para o este ensaio foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer e posteriormente o ajuste para 15×10^5 células/mL para as células peritoneais e 10×10^5 células/mL para os esplenócitos, em meio RPMI 1640 suplementado (10% de albumina de soro bovino - BSA -, antibióticos 1% - penicilina 100 U/mL e estreptomicina 1 μ g/mL). As células foram então transferidas para placa de 96 poços de fundo chato e fundo "U", na concentração de $1,5 \times 10^5$ e 1×10^5 células/poço para células peritoneais e esplenócitos, respectivamente.

Células peritoneais: após o período de 2 horas para adesão, as placas foram lavadas com PBS e então os poços receberam 50 μ L de E-Bd diluído em meio RPMI 1640, com 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec), de modo a atingir as concentrações de 100, 50 e 25 μ g/mL e então as placas foram incubadas novamente por períodos de 24 e 48 horas à 37 °C em estufa com 5% CO₂.

Esplenócitos: Imediatamente após a transferência das células para as placas, foi adicionado 50 μL de E-Bd diluído em RPMI 1640 com 0,1% de DMSO para obtenção das concentrações de 100, 50 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C em estufa com 5% CO_2 .

Após os períodos de incubação, foram retirados os sobrenadantes e adicionados, em cada poço, 100 μL da solução de meio RPMI 1640 e 10 μL do reagente MTT na concentração de 5mg/mL, mantendo a placa protegida da luz. A placa foi homogeneizada e novamente incubada em estufa com 5% CO_2 à 37°C, por 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram retirados, e foram adicionados 100 μL de DMSO por poço. A placa foi agitada a 150 rpm/10 minutos e a absorbância foi medida em leitora de microplacas (TP Reader) no comprimento de onda de 550 nm.

4.5.2 Ensaio de proliferação de esplenócitos

Para o ensaio de proliferação, os esplenócitos foram estimulados com Concanavalina A (ConA, Sigma) na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como mitógeno, e receberam os tratamentos com o extrato E-Bd nas concentrações supracitadas. Após incubação (72h) foram retirados os sobrenadantes e adicionados, em cada poço, 100 μL da solução de meio RPMI 1640 e 10 μL do reagente MTT na concentração de 5 mg/mL, mantendo a placa protegida da luz. A placa foi então homogeneizada e novamente incubada em estufa com 5% CO_2 à 37°C, por 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram retirados, e foram adicionados 100 μL de DMSO por poço. Após agitação a 150 rpm/10 minutos a medida da absorbância foi realizada em leitora de microplacas (TP Reader) no comprimento de onda de 550 nm, como feito para os ensaios de citotoxicidade.

4.6 Avaliação dos efeitos imunomodulatórios do extrato

4.6.1 Produção de óxido nítrico

Após 24 horas de incubação em cultura, 50 μL dos sobrenadantes das culturas de células peritoneais e de esplenócitos foram colocados nos poços de microplacas de 96 poços de fundo chato para dosagem de nitrito utilizando o reagente de Griess (Sulfanilamida 1% e α -naftil etilenodiamina 0,1%). Em seguida à adição dos sobrenadantes, foram acrescentados 50 μL /poço da mistura dos reagentes sulfanilamida 1% e α -naftil etilenodiamina 0,1% em H_3PO_4 2,5% (Sigma) (1:1 v/v). A absorbância foi lida à 540 nm em uma leitora automática de microplacas (TP READER NM). A produção de NO foi quantificada através de comparação com uma curva padrão de nitrito em concentrações variando de 3,125 a 200 μM , sendo os resultados expressos em μM (DING, NATHAN, STUER, 1988).

4.6.2 Produção de IL-12

Para a dosagem de IL-12 FOI utilizada a técnica de ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Becton & Dickinson). De acordo com este protocolo, as placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, para a citocina avaliadas, diluídos em PBS, e incubadas *overnight* à temperatura ambiente. Após a lavagem das placas com PBS-Tween 20 0,1% (PBS-T) por quatro vezes, estas foram incubadas com a solução de bloqueio por duas horas (PBS-Tween 20 0,1% + soro fetal bovino 10%). Após este período, as placas foram lavadas novamente quatro vezes em PBS-T e, em seguida, foi adicionado o padrão da citocina (Becton

& Dickinson) e as amostras, aliquotadas a partir dos sobrenadantes da cultura de células. As placas foram então incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Terminado este período, as placas foram lavadas mais quatro vezes em PBS-T e os anticorpos de detecção biotinilados (Becton & Dickinson) adicionados e as placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir mais quatro lavagens com PBS-T foram realizadas e foi adicionado o conjugado enzimático constituído do complexo streptoavidina-peroxidase, na diluição de 1/400 (Sigma), seguido de incubação por 1 hora. Após este período, a reação foi revelada pela adição do substrato contendo tampão citrato (pH 5,5) e cromógeno ácido 2,2-diazino etilbenzotialino sulfônico (ABTS) 30% (1µg/mL). A medida da absorbância foi realizada em leitora de microplacas (TP READER NM) a 440 nm. As amostras foram quantificadas com base na curva padrão construída de acordo com as concentrações indicadas pelo fabricante e os resultados expressos em pg/mL (limite de detecção 16pg/mL).

4.6.3 Expressão de moléculas co-estimuladoras

As células peritoneais foram coletadas das placas de 24 poços com 200µL de tampão de Facs gelado (PBS + BSA 0,5% + azida de sódio 1%) e transferidas para placas de 96 poços de fundo em "U" que foram então centrifugadas em centrífuga refrigerada (4°C) por 5 minutos, à 1500 rpm e após este processo os sobrenadantes foram descartados. Foram então adicionados 20µL dos anticorpos anti-CD40 BV421, e anti-CD80, anti-CD86 e anti-MHC II conjugados à ficoeritrina (PE) (Becton & Dickinson) para marcação das células durante 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 150µL de tampão de Facs e as placas foram novamente centrifugadas e seus sobrenadantes descartados sendo repetido este procedimento duas vezes. Então, foram adicionados 100µL do tampão de Facs, e as suspensões de células foram transferidas para tubos de ensaio para realização da leitura em citômetro de fluxo (Becton Dickinson).

As células foram definidas através do tamanho *versus* granulosidade (FSC x SSC). Para cada leitura foram obtidos 30.000 eventos e as médias de intensidade de fluorescência (MFI) foram analisadas a partir de histogramas representando o log da fluorescência por PE pela contagem de células.

4.7 Análises estatísticas

As variáveis numéricas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguida de teste Tukey (GraphPad Prism®) e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão sendo considerados significativos os valores com $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos procedimentos descritos foram obtidos 120g do extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia* (E-Bd) e este extrato foi submetido à análise por CLAE conforme apresentado no cromatograma (Figura 7).

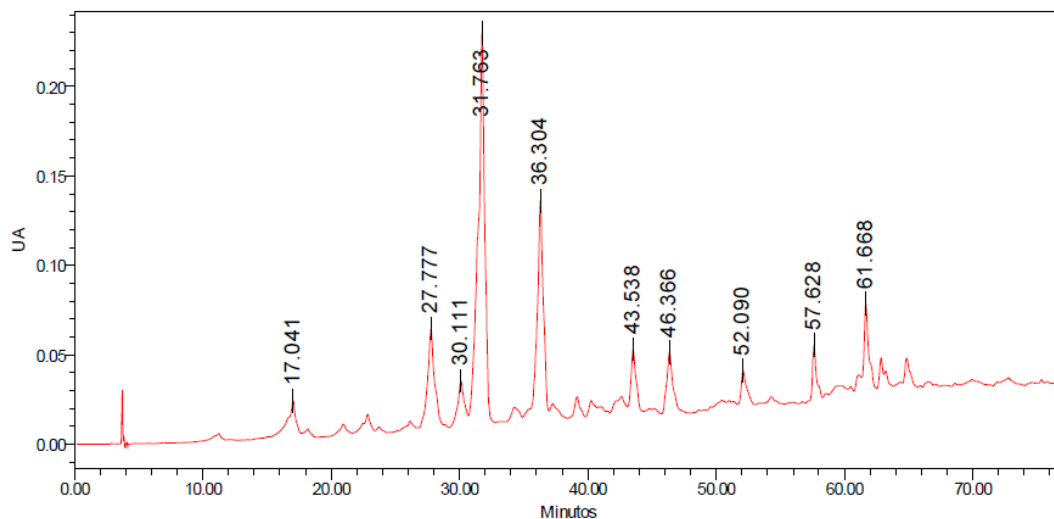


Figura 7. Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *B. dracunculifolia*. Injeção de 30 μ L de E-Bd em coluna C18; 4,6 x 250 mm; 5 μ m. Fase móvel: H_3PO_4 em água até pH = 3 (A) e metanol (B), variando de 20 a 95% de B (0 - 77 min), fluxo de 0,8 mL/min, $\lambda = 290$ nm.

A análise por CLAE-DAD do extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *B. dracunculifolia* permitiu observar a presença de diversos compostos. Estudos que investigaram a constituição química das partes aéreas de *B. dracunculifolia* já haviam demonstrado a complexidade deste extrato, sendo os principais constituintes encontrados os derivados do ácido cumárico, e flavonoides (VERDI, BRIGHENTE, PIZZOLATTI, 2005; FIGUEIREDO-RINHEL et al., 2013).

Foi possível observar que estão presentes no extrato E-Bd ácidos fenólicos e flavonoides, com base nos espectros de ultravioleta (Figura 8 a-j), e na literatura. O padrão de absorção com $\lambda_{\text{máx}}$ em 270 e 334 nm é característico da estrutura de flavonas (Figura 8 h). Já os padrões de absorção com $\lambda_{\text{máx}}$ em 218, 241 e 327 nm

(Figura 8 a, d, e, f) e em 227 e 309 nm (Figura 8 b), são característicos de ácidos fenólicos. Os demais padrões de absorção apresentados (Figura 8 c, g, i, j) não permitiram concluir a que classe pertencem os respectivos compostos (TILLEQUIN et al., 1978; BORELLA et al., 2005; HUBER, RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; MARTINS et al., 2015).

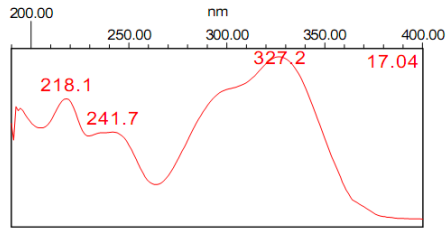
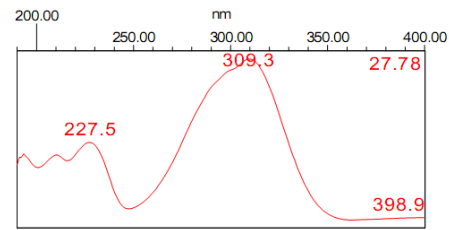
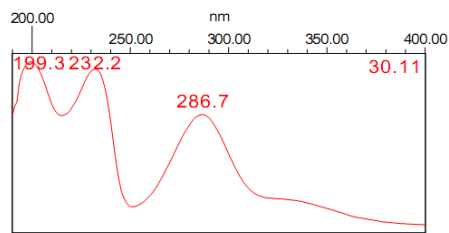
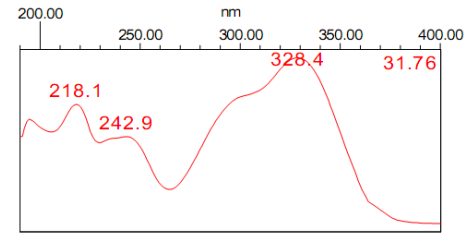
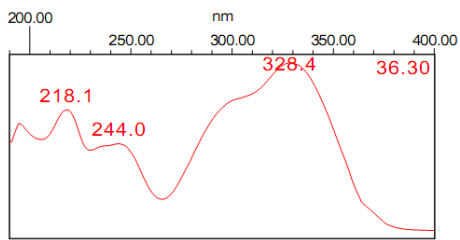
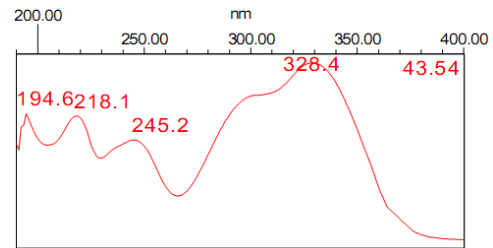
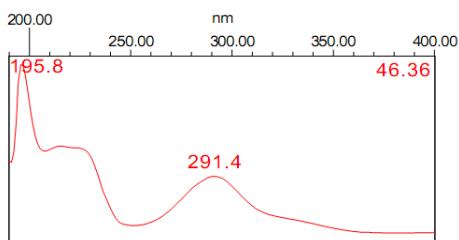
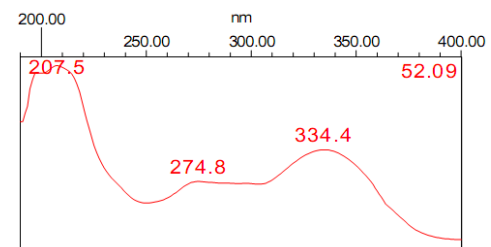
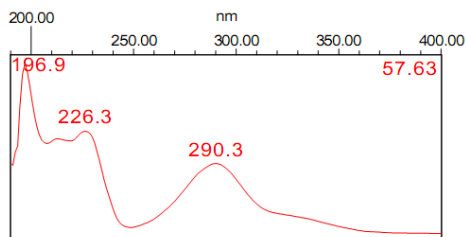
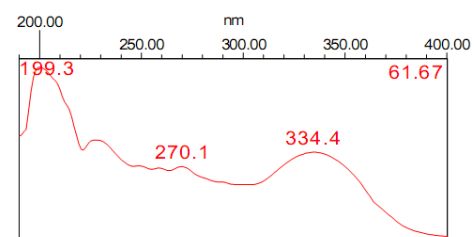
a) $T_r = 17,041$ b) $T_r = 27,777$ c) $T_r = 30,111$ d) $T_r = 31,763$ e) $T_r = 36,304$ f) $T_r = 43,538$ g) $T_r = 46,366$ h) $T_r = 52,090$ i) $T_r = 57,628$ j) $T_r = 61,668$ 

Figura 8. Espectros de ultravioleta dos principais picos apresentados no cromatograma obtido após análise por CLAE do extrato E-Bd.

Estes achados estão de acordo com os estudos fitoquímicos encontrados na literatura, que relatam a presença destes tipos de compostos em extratos de *B. dracunculifolia*, indicando que os compostos mais comumente relacionados às atividades biológicas da espécie estão presentes no extrato E-Bd (TILLEQUIN et al., 1978; BORELLA et al., 2005; HUBER, RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; MARTINS et al., 2015).

Em relação aos ensaios biológicos, no teste realizado com MTT, não foi observada citotoxicidade do extrato E-Bd nas concentrações avaliadas, de 100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$ em células peritoneais ou em esplenócitos, tendo sido a viabilidade de mais de 90% das células conforme mostram as figuras 9 e 10.

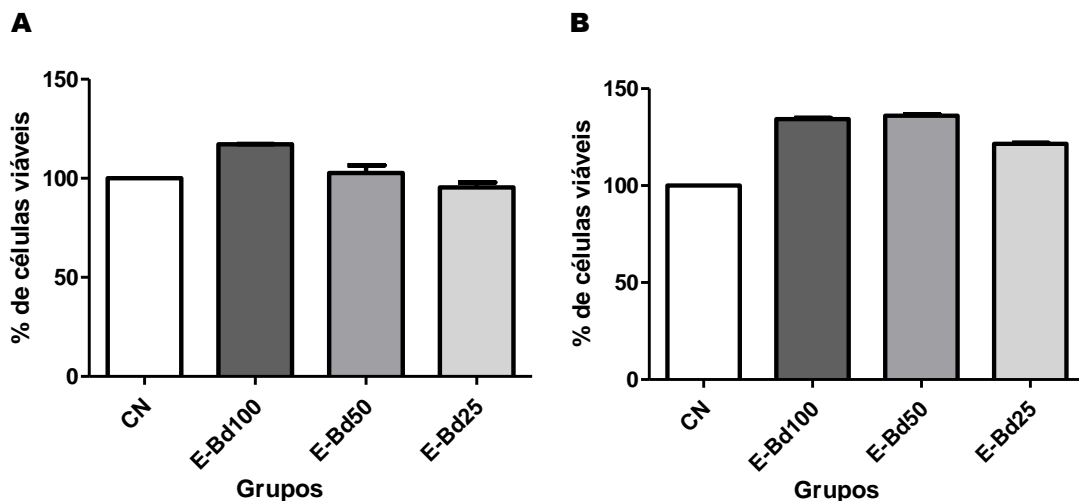


Figura 9. Viabilidade de macrófagos peritoneais (%) em relação ao grupo controle negativo (CN) após incubação com diferentes concentrações (100, 50 e 25mg/mL) do extrato E-Bd em A) 24 horas e B) 48 horas. Os dados foram expressos como média \pm SD.

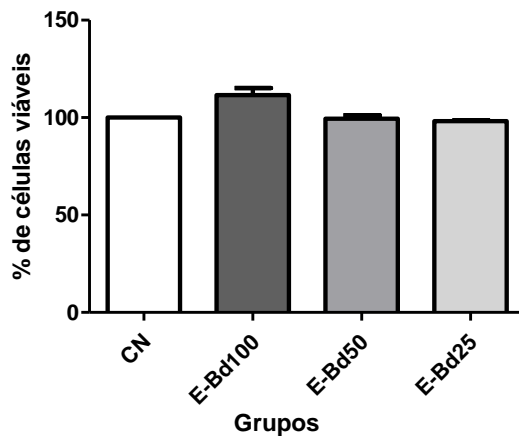


Figura 10. Viabilidade de esplenócitos (%) em relação ao grupo controle negativo (CN), após incubação com diferentes concentrações (100, 50 e 25mg/mL) do extrato E-Bd em 48 horas. Os dados foram expressos como média \pm SD.

Embora não existam na literatura estudos que tenham avaliado extratos de *B. dracunculifolia* nestes tipos celulares, nestas concentrações, a não citotoxicidade em macrófagos peritoneais do extrato bruto hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* a 20 $\mu\text{g/mL}$ já foi observada, bem como a não citotoxicidade também do extrato hidroalcoólico de folhas a 50 $\mu\text{g/mL}$ em neutrófilos humanos. Foi observado ainda que o lavado diclorometânico das folhas não foi citotóxico em células Vero em concentrações até 45 $\mu\text{g/mL}$, (DA SILVA FILHO et al., 2009; JOHANN et al., 2010; FIGUEIREDO-RINHEL et al., 2013).

Esplenócitos foram ainda estimulados com Concanavalina A (ConA) a fim de se avaliar o efeito do extrato E-Bd na proliferação destas células. Em relação ao grupo que não recebeu o estímulo com ConA, o grupo estimulado e não tratado exibiu aumento significativo na proliferação celular, indicando importante efeito deste mitógeno. Nos grupos tratados com o extrato, foi possível observar redução significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) na proliferação dos esplenócitos nas concentrações não citotóxicas de 100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 11).

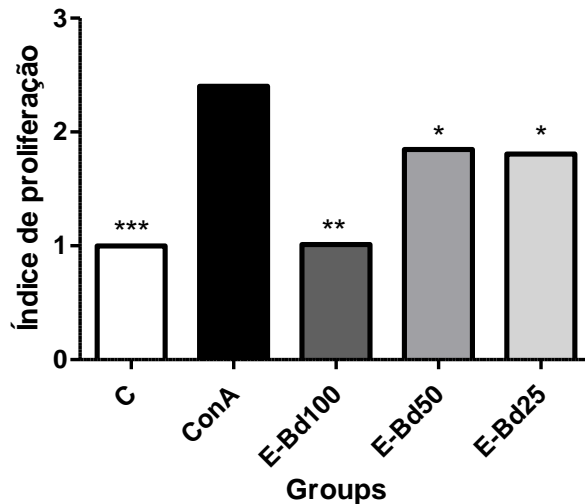


Figura 11. Índice de proliferação de esplenócitos em 72h na ausência do estímulo (CN, controle negativo), e após o estímulo com ConA e com os tratamentos com E-Bd em três concentrações 100, 50 e 25 mg/ml. Os dados foram expressos como média \pm SD e foram considerados significativos em relação ao grupo estimulado (ConA), os resultados com $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

É a primeira vez que o extrato da espécie é avaliado frente a proliferação de esplenócitos. Estes resultados corroboram com os achados do nosso grupo (dados ainda não publicados) em relação à produção de citocinas por esplenócitos. Neste estudo, o extrato E-Bd foi capaz de reduzir a produção de diferentes citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-17 e IL-4, por cultura de esplenócitos. Essa redução pode ser justificada pela inibição da proliferação desse tipo celular (LEAL, 2014).

Em relação à produção de óxido nítrico o extrato E-Bd foi capaz de reduzir sua produção por macrófagos peritoneais e esplenócitos após estímulo com LPS nas três concentrações avaliadas (100, 50 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e ainda após estímulo dos macrófagos peritoneais pelo IFN- γ nas duas maiores concentrações (100 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sugerindo um possível efeito concentração dependente nos esplenócitos, e nos macrófagos peritoneais quando estimulados com LPS e IFN- γ , como mostra a figura 12.

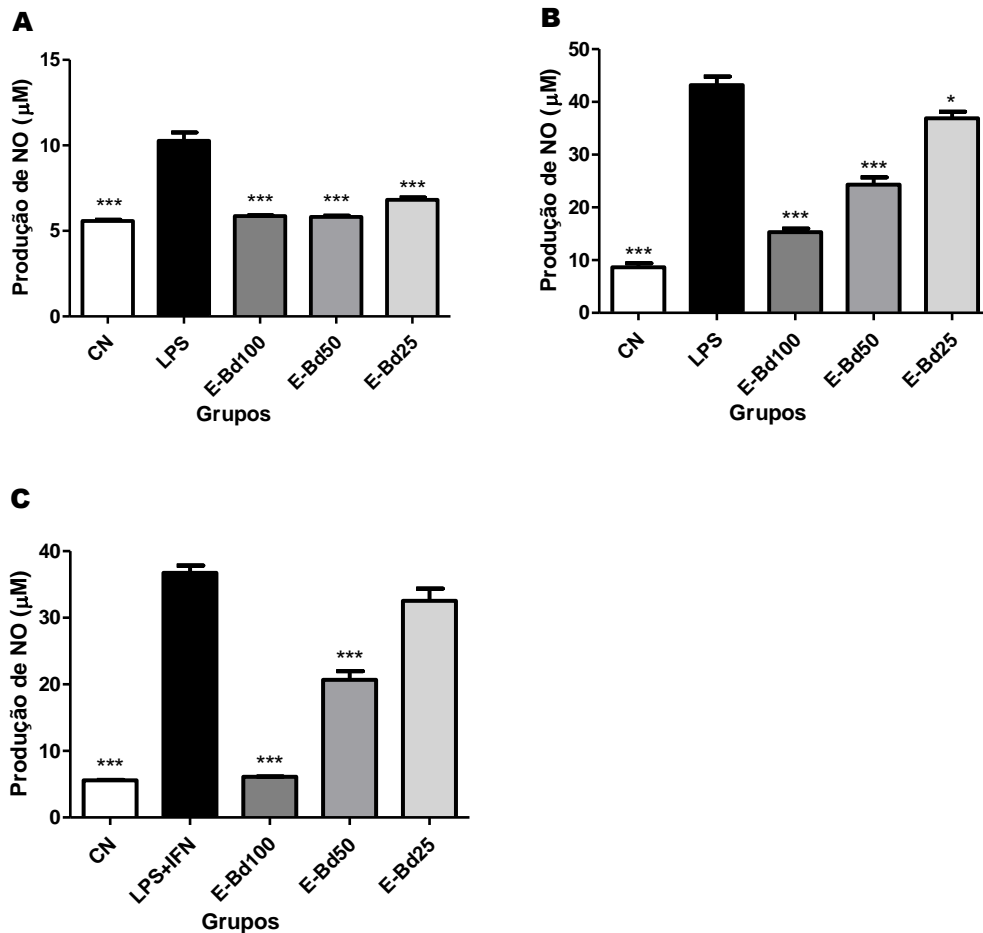


Figura 12. Produção de óxido nítrico na ausência (CN, controle negativo) e na presença de estímulo e de diferentes concentrações (100, 50 e 25mg/mL) de E-Bd: A) por cultura de macrófagos, após estímulo com LPS, B) por cultura de esplenócitos após estímulo com LPS e C) por cultura de macrófagos após estímulo com LPS e IFN- γ . Os dados foram expressos como média \pm SD e foram considerados significativos em relação aos grupos estimulados (LPS/LPS+IFN), os resultados com $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)

O óxido nítrico exerce um importante papel em diversos processos como inflamação, carcinogênese e aterosclerose, e seu excesso causa um dano oxidativo aos lipídios de membrana, ao DNA, à proteínas e lipoproteínas, levando a morte celular. Por isso, a descoberta de substâncias que previnam uma superprodução de NO podem trazer benefícios no tratamento de diversas doenças. O LPS derivado das bactérias Gram negativas pode ser um indutor de iNOS em vários tipos celulares, incluindo macrófagos, desencadeando respostas celulares danosas e promovendo processos inflamatórios (TAIRA, NANBU, UEDA, 2009).

Lopes e colaboradores (2003) ao avaliar a atividade do extrato de *B. dracunculifolia* e de própolis sobre macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Balb/c, verificaram que a própolis levou a um aumento da produção de H₂O₂ e redução de NO, enquanto que o extrato da espécie vegetal não alterou os níveis destes mediadores. Não existem outros trabalhos na literatura que apresentem resultados da atividade de extratos de *B. dracunculifolia* frente à produção de óxido nítrico, porém, no estudo de Missima e colaboradores os extratos de folhas e de raiz de *B. dracunculifolia* promoveram aumento na produção de H₂O₂ por macrófagos obtidos de camundongos Balb/c assim como foi observado para a própolis no estudo supracitado (LOPES, BANKOVA, SFORCIN, 2003; MISSIMA et al., 2006).

Além disso, diversos constituintes encontrados em extratos de *B. dracunculifolia* como drupanina, artepilina C, ermanina, AME e canferido já foram avaliados frente à produção de óxido nítrico por diferentes linhagens celulares apresentando redução de seus níveis, indicando o potencial dos extratos da espécie em promover essa redução (TAIRA, NANBU, UEDA, 2009; JEONG et al., 2011; SZLISZKA et al., 2013; GAO et al., 2014; YAHAGI et al., 2014).

As divergências nestes resultados podem ser devido às variações encontradas nos extratos de *B. dracunculifolia* de acordo com a localidade da coleta do material vegetal, sazonalidade e forma de obtenção do extrato que podem alterar sua composição quantitativamente e qualitativamente.

O extrato E-Bd foi ainda avaliado frente à produção de IL-12 por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e IFN- γ . Este foi capaz de reduzir significativamente a produção da citocina em questão nas duas maiores concentrações não citotóxicas avaliadas, de 50 e 100 μ g/mL ($p < 0,001$), como mostrado na figura 13.

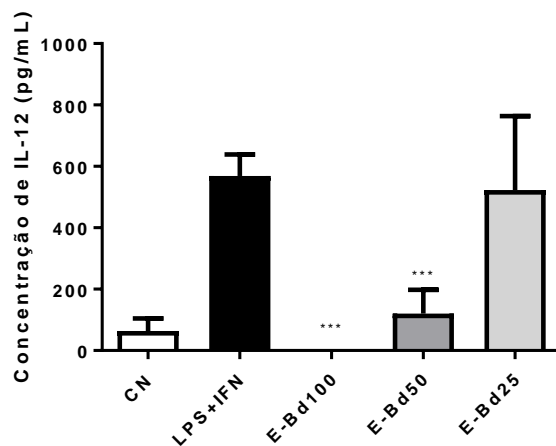


Figura 13. Produção de IL-12 na ausência do estímulo (CN, controle negativo), e na presença do extrato E-Bd (100, 50 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por macrófagos peritoneais após estímulo (LPS e $\text{IFN-}\gamma$). Os dados foram expressos como média \pm SD e foram considerados significativos em relação aos grupos estimulados (LPS/LPS+IFN), os resultados com $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)

Em nosso grupo, os resultados de trabalhos prévios ainda não publicados, citados anteriormente neste trabalho, indicaram a capacidade do extrato E-Bd em reduzir ainda a produção das citocinas $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-17 e IL-4. Uma vez que as três últimas são produzidas principalmente por linfócitos, e de diferentes subpopulações ($T_{\text{h}1}$, $T_{\text{h}2}$ e $T_{\text{h}17}$), a inibição da produção de todas elas, pode indicar uma atividade do extrato E-Bd em etapa anterior à ativação destas células (MESQUITA-JUNIOR et al., 2010; SILVA et al., 2013; LEAL, 2014).

Sendo assim, a partir do efeito anti-proliferativo observado na cultura de esplenócitos, em conjunto com a redução da produção de citocinas por este mesmo tipo celular, sugerindo ação do extrato em etapa anterior à sua ativação, realizou-se o ensaio de citometria de fluxo para análise da expressão de moléculas co-estimuladoras, que participam no processo de apresentação antigênica, tendo, portanto, importante papel no momento da interação entre imunidade inata e adaptativa, com ativação desta.

Em relação aos resultados obtidos foi possível observar que o extrato E-Bd levou à redução da expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, e não alterou significativamente a expressão da molécula de MHC II, por macrófagos

peritoneais estimulados com LPS e IFN- γ . Estes resultados estão expressos na figura 14.

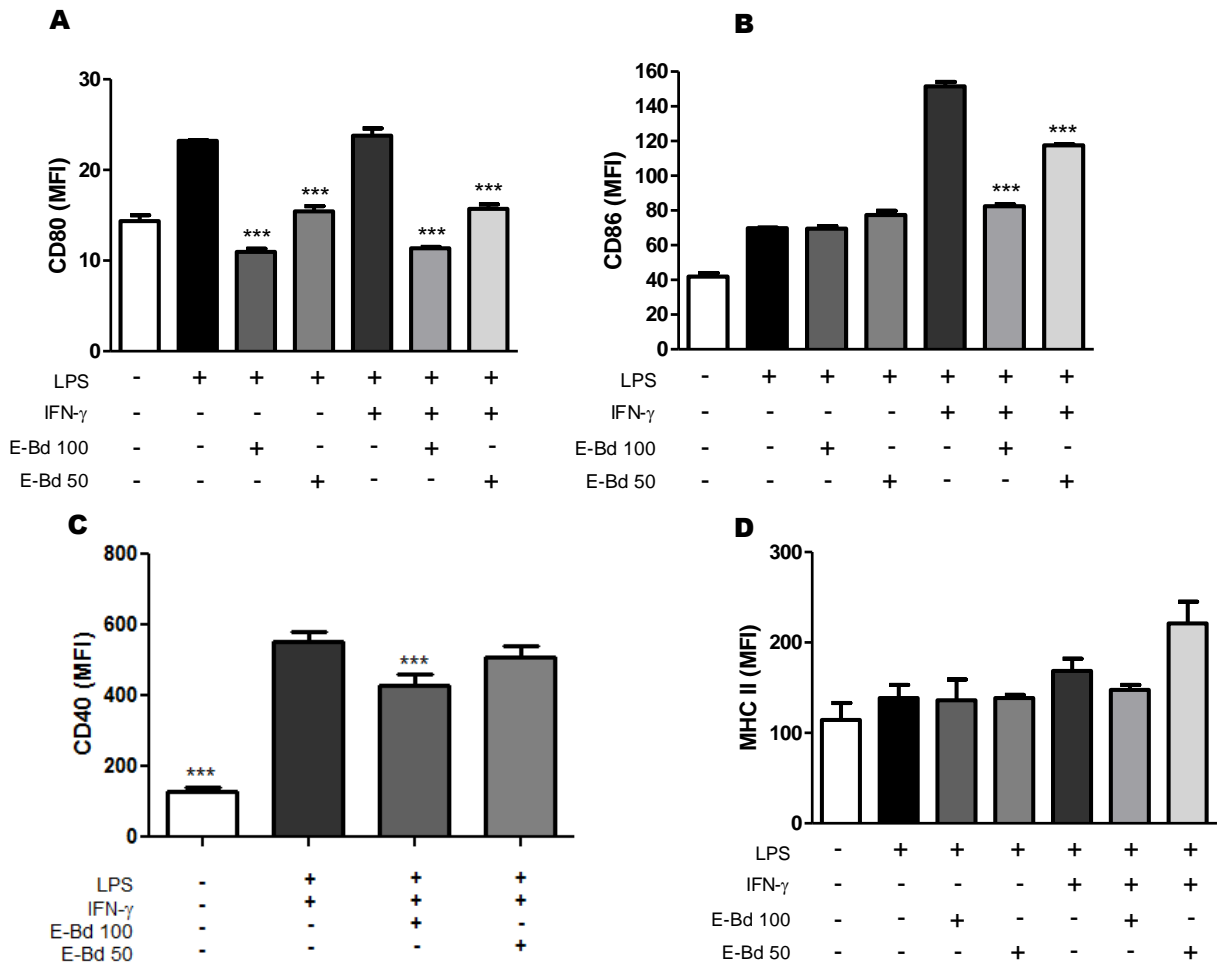


Figura 14. Efeitos do extrato E-Bd nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ na expressão de A) CD80, B) CD86, C) CD80 e D) MHC II, na ausência de estímulos (CN, controle negativo), e na presença de estímulos (LPS e IFN- γ). Os dados foram expressos como média \pm SD, e foram considerados significativos em relação aos grupos estimulados (LPS/LPS+IFN- γ) os resultados com $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)

Ainda, a redução na expressão da molécula CD40 foi observada em macrófagos estimulados com LPS, que receberam o extrato E-Bd. Este foi capaz de promover redução estatisticamente significativa da expressão de CD40 nas duas maiores concentrações avaliadas (100 e 50 $\mu\text{g/mL}$, com $p < 0,001$ e $p < 0,01$) (Figura 14).

Esta é a primeira vez que o extrato de *B. dracunculifolia* é avaliado frente à expressão de moléculas co-estimuladoras. Uma vez que estas moléculas indicam ativação de macrófagos para inflamação aguda e são moléculas fundamentais na apresentação de antígenos aos linfócitos desencadeando a resposta imunológica adaptativa, elas podem representar um alvo interessante para ação de novas moléculas com a finalidade de se modular as respostas imunológicas (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012; DAI et al., 2015).

A inibição da expressão das moléculas CD40, CD80 e CD86 pelo extrato em questão, vai de encontro aos resultados das análises de proliferação e de produção de citocinas em esplenócitos, demonstrando que o prejuízo causado à apresentação antigênica devido à redução na expressão de moléculas co-estimuladoras, é, provavelmente, o responsável pela menor intensidade da ativação das células T.

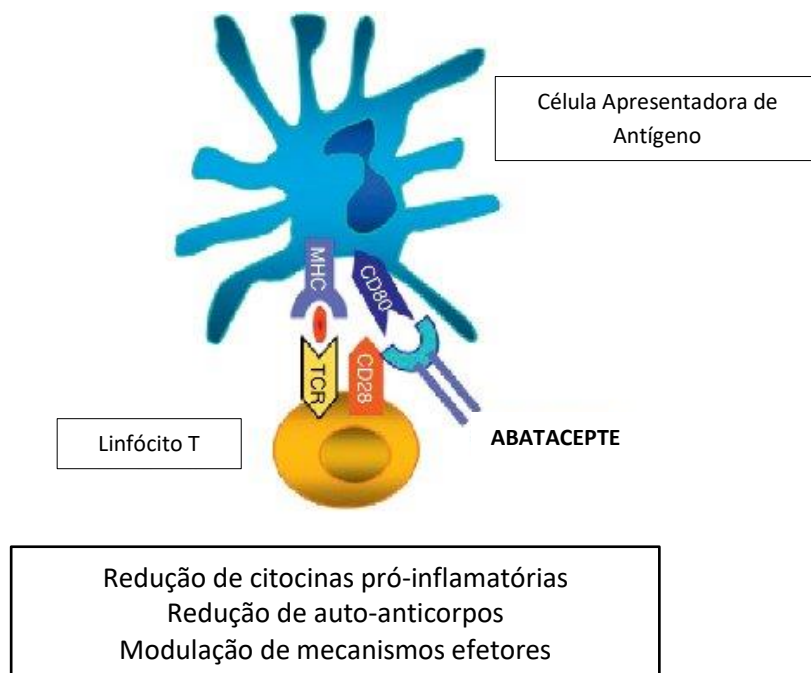
A molécula de superfície CD40 pertence à superfamília dos receptores de fator de necrose tumoral e é amplamente expressa em monócitos/macrófagos, e também em células dendríticas e linfócitos B. Nos macrófagos, essa molécula tem um papel importante em sua ativação, uma vez que a ligação a este receptor promove liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α , além da produção de NO.

Rezai-Zadeh e colaboradores (2008) demonstraram a capacidade de duas flavonas, denominadas apigenina e luteolina (Figura 15 a e b), em reduzir a expressão da molécula CD40 em células da micróglia, e enfatizaram a atividade anti-inflamatória dessas substâncias (REZAI-ZADEH et al., 2008; SHI et al., 2015).

Em relação ao CD80 e CD86, Yoon e colaboradores (2006) identificaram também um efeito supressor na expressão dessas moléculas desencadeado pela apigenina, além da supressão da expressão de MHC I e II. Apesar de não terem sido encontrados relatos na literatura da identificação dessa flavona na espécie *B. dracunculifolia*, já foi verificada a presença de flavonas como acacetina e crisina, não havendo estudos publicados na literatura avaliando sua atividade frente à expressão de moléculas co-estimuladoras. Além disso, a presença da apigenina já foi detectada em extratos aquosos e hidroalcoólicos da própolis brasileira (YOON et al., 2006; FAROOQUI, FAROOQUI, 2010).

Atualmente, encontra-se disponível no mercado o fármaco Abatacepte, um imunossupressor utilizado para artrite reumatoide. Seu mecanismo de ação baseia-se na ligação à molécula CD80 inibindo assim a ativação das células T, envolvidas na patogênese e manutenção da doença, apresentando, portanto, efeito semelhante ao proposto para o extrato em questão (Figura 15) (YU et al., 2013).

Em estudo comparativo entre o uso dos fármacos Abatacepte, e Adalimumab, um anticorpo monoclonal também amplamente utilizado na artrite reumatoide, foi demonstrado não haver diferença significativa no benefício obtido após o tratamento, tendo-se concluído então, a não inferioridade do primeiro, em relação ao segundo. Além disso, Furie e colaboradores (2014) comprovaram a eficácia do Abatacepte em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) (WEINBLATT et al., 2013; FURIE et al., 2014).



Fonte: Adaptado de MOLA et al., 2013

Figura 15. Mecanismo de ação do Abatacepte e seus efeitos supressores da resposta imunológica

Dessa forma, é possível concluir a importância da possibilidade de desenvolvimento de terapias farmacológicas que visem bloquear os processos de co-estimulação em doenças auto-imunes e inflamatórias crônicas, nas quais as

células T CD4⁺ tenham um papel importante em sua imunopatogenia e manutenção (COQUET, RAUSCH, BORST, 2015).

Mais estudos são necessários a fim de se avaliar melhor os mecanismos de ação, os modelos em que é aplicável e qual a melhor forma de utilização do extrato E-Bd a fim de otimizar sua atividade e desenvolver uma nova opção terapêutica para as doenças causadas pelo sistema imunológico.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que o extrato bruto de *Baccharis dracunculifolia* E-Bd, apresenta as principais classes de constituintes encontradas na espécie, que são os ácidos fenólicos e os flavonoides. Este extrato, não foi citotóxico nos tipos celulares em que foi avaliado, em concentrações até 100 µg/mL e apresentou importante atividade imunomoduladora frente às principais células da imunidade inata e adquirida, reduzindo a produção de mediadores da resposta imune. Os efeitos observados podem se dar devido à inibição da proliferação de esplenócitos e da expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 e CD40), essenciais para a apresentação antigênica, e desenvolvimento da resposta imunológica específica. Dessa maneira, este extrato pode ser promissor para o tratamento de desordens imunológicas nas quais o sistema imune cause danos ao organismo, uma vez que promove supressão das respostas.

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J., BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): A review update. **Arkivoc**, v. vii, p. 76-96, 2007.

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 7ª edição, São Paulo: Elsevier, 2012, 354 p. 3, 37, 84-85.

AJAIYEGBA, E. O. et al. Inhibitory activities of selected South west Nigerian Medicinal Plants against *Mycobacterium tuberculosis*. **African Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 42, p. 91-95, 2013.

AZIKE, C. G., et al. The Yin and Yang actions of North American ginseng root in modulating the immune function of macrophages. **Chinese Medicine**, v. 6, ed. 21, p. 1-11, 2011.

BACHIEGA, T. F., et al. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. **Natural Products Research**, v. 27, ed. 18, p. 1646-1650, 2013.

BELMIRO, M. S., OKI, Y., FERNANDES, G. W. *Própolis: nosso teouro*. APACAME – Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíferas Europeias, 2011.

BISAGA, G. N. et al. Treatment of exacerbations of multiple sclerosis without the use of corticosteroids: The role of metabolic and antioxidant therapy. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, v. 42, n. 2, p. 123-27, 2012.

BORELLA, J. C. et al. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, ed. 4, p. 557-561, 2006.

BUDEL, J. M., et al. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I – Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, ed. 3, p. 268-271, 2005.

CESTARI, S. H., BASTOS, J. K., DI STASI, L. C. Intestinal Anti-Inflammatory Activity of *Baccharis dracunculifolia* in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

COPE, A., et al. The Th1 life cycle: molecular control of IFN- γ to IL-10 switching. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 6, p. 278-286, 2011.

COQUET, J. M., RAUSCH, L., BORST, J. The importance of co-stimulation in the orchestration of T helper cell differentiation. **Immunology and Cell Biology**, v. 93, p. 780-788, 2015.

COSTA-SILVA, T. A. et al. Immunomodulatory and Antileishmanial Activity of Phenylpropanoid Dimers Isolated from *Nectandra leucanta*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 4, p. 653-657, 2014.

CRUVINEL, W. M., et al. Immune system – Part I - Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Brazilian Journal of Rheumatology**, v. 50, ed. 4, p. 434-461, 2010.

DAI, H., et al. Transmembrane protein 106a activates mouse peritoneal macrophages via the MAPK and NF- κ B signaling pathways. **Scientific Reports**, v. 5, ed. 12461, p. 1-11, 2015.

DA SILVA FILHO, A. A., et al. In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1195–1199, 2004.

DA SILVA FILHO, A. A. et al. Antimicrobial Activity of the Extract and Isolated Compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63 c, p. 40-46, 2007.

DA SILVA FILHO, A. A., et al. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, p. 478-482, 2009.

DEGUINE, J., BARTON, G. M. MyD88: a central player in innate immune signaling. **F1000 Prime Reports**, v. 6, ed. 97, p. 1-7, 2014.

DE SOUZA, J. P. B. et al. Seasonality Role on the Phenolics from Cultivated *Baccharis dracunculifolia*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

DING, A., NATHAN, C.F., STUER, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, v.141, p.2407-2503, 1988

DOS SANTOS, D. A., et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 543-550, 2009.

FAROOQUI, T., FAROOQUI, A. A. Molecular Mechanism Underlying the Therapeutic Activities of Propolis: A Critical Review. **Current nutrition & Food Science**, v. 6, p. 1-15, 2010.

FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G., et al. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 655-664, 2013.

FURIE, R., et al. Efficacy and safety of Abatacept in lupus nephritis. **Arthritis and Reumathology**, v. 66, n. 2, p. 379-389, 2014).

GAO, H. Y., et al. Constituents from Zhuyeqing Liquor and their inhibitory effects on nitric oxide production. **Phytochemistry Letters**, v. 7, p. 150-155, 2014.

GERTSCH, J., VIVEROS-PAREDES, J. M., TAYLOR, P. Plant immunostimulants - Scientific paradigm or myth? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 385-301, 2011.

GORDON, S.; UNKELESS, J. C.; COHN, Z. A. Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis is; evidence for a two-stage process. *Journal of Experimental Medicine*, 140(4):995-1010, 1974.

GILMAN, A. G. As bases farmacológicas da terapêutica. 10ª edição, Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2001, p. 1097-1101.

GUIMARÃES, N. S. S., et al. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1091-1097, 2012.

HOBBS, A. J., HIGGS, A., MONCADA, S. inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 191-220, 1999.

HUBER, L. S., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e Flavonas: Fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

ICHIYAMA, K., et al. Transcription Factor Smad-Independent T Helper 17 Cell Induction by Transforming-Growth Factor- β Is Mediated by Suppression of Eomesodermin. **Immunity**, v. 34, p. 741-754, 2011.

JEONG, E. J., et al. Inhibitory constituents of *Euonymus alatus* leaves and twigs on nitric oxide production in BV2 microglia cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1394-1398, 2011.

JI, N. F., et al. Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model. **International Immunopharmacology**, v. 21, p. 76-81, 2014.

JOHANN, S., et al. Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, ed. 4, p. 388-396, 2010.

JYONOUCHI, S., SULLIVAN, K. E. Deficiencies of Innate and Adaptive Immunity. **ACP Medicine**, 2013.

KANG, S. R., et al. Suppressive Effect on Lipopolysaccharide-Induced Proinflammatory Mediators by *Citrus aurantium* L. in Macrophage RAW264.7 Cells via NF- κ B Signal Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-12, 2011.

KU, C. M., LIN, J. Y. Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoid compounds tested through modulating Th1/Th2 cytokine secretion profiles using murine primary splenocytes. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1104-1113, 2013.

KUMAZAWA, S. et al. Direct Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behavior and Phytochemical Analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, ed. 6, p. 740-742, 2003.

LEAL, D. M. C. Avaliação da atividade imunomodulatória in vitro do extrato bruto e de metabólitos secundários de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). 04/ago/2014. 99 páginas. Dissertação – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 04/ago/2014.

LEE, D. H., GOLD, R., LINKER, R. A. Mechanisms of Oxidative Damage in Multiple Sclerosis and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Modulation via Fumaric Acid Esters. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 11783-11803, 2013.

LI, W., et al. Anti-inflammatory effect of tetrahydrocoptisine from *Corydalis impatiens* is a function of possible inhibition of TNF- α , IL-6 and NO production in lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 715, p. 62-71, 2013.

LIU, X. B., et al. An in vivo and in vitro assessment of the anti-inflammatory, antinociceptive, and immunomodulatory activities of *Clematis terniflora* DC. extract, participation of aurantiamide acetate. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, p. 287-294, 2015.

LOPES, F. C., BANKOVA, V., SFORCIN, J. M. Effect of three vegetal sources of propolis on macrophages activation. **Phytomedicine**, v. 10, p. 343, 2003.

MAJDALAWIEH, A. F.; FAYYAD, M. W. Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: A comprehensive review. **International Immunopharmacology**, v. 28, p. 295-304, 2015.

MARTINS, V. C. et al. Caracterização química da polpa do fruto Jerivá (*Syagrus romanzoffiana* Cham.). **Revista Virtual de Química**, v. 7, ed. 6, p. 2422-2437, 2015.

MESQUITA-JUNIOR, D., et al. Immune System – Part II - Basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. **Brazilian Journal of Rheumatology**, v. 50, ed. 5, p. 552-580, 2010.

MISSIMA, F., et al. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 463-468, 2007.

MOLA, E. M., et al. El uso de abatacept en artritis reumatoide: revisión de la evidencia y recomendaciones. **Reumatología clínica**, v. 9, n. 1, p. 5-17, 2013.

MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. Immunobiologia de Janeway. 7ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 322, 420.

NAGATANI, Y., WARASHINA, T., NORO, T. Studies on the Constituents from the Aerial Part of *Baccharis dracunculifolia* DC. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, ed. 11, p. 1388-1394, 2001.

NAGATANI, Y., WARASHINA, T., NORO, T. Studies on the Constituents from the Aerial Part of *Baccharis dracunculifolia* DC. II. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, ed. 5, p. 583—589, 2002a.

NAGATANI, Y., WARASHINA, T., NORO, T. T. Studies on the Constituents from the Aerial Part of *Baccharis dracunculifolia* DC. III. **Natural Medicines**, v. 56, ed. 5, p. 195-197, 2002b.

NEWTON, K., DIXIT, V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, p. 1-19, 2012.

PARK, Y. K., et al. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100-1103, 2004.

RANG, H. P., et al. Farmacologia. 6ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, p. 226.

RESENDE, F. A., et al. Comparative Studies of the (Anti) Mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepillin C by the Bacterial Reverse Mutation Test. **Molecules**, v. 17, p. 2335-2350, 2012.

REZAI-ZADEH, K., et al. Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, ed. 41, p. 1-10, 2008.

REZENDE, T. P., et al. Protective Effects of *Baccharis dracunculifolia* Leaves Extract against Carbon Tetrachloride- and Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Experimental Animals. **Molecules**, v. 19, p. 9257-9272, 2014.

RICCIARDOLO, F. L. M., et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 3, p. 731-765, 2004.

ROCHA-JUNIOR, L. F., et al. PPAR γ Agonists in Adaptive Immunity: What Do Immune Disorders and Their Models Have to Tell Us? **PPAR Research**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

SFORCIN, J. M., et al. *Baccharis dracunculifolia* – Uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira. São Paulo: Editora UNESP, 2012, p. 9-10.

SHI, Y., et al. Synergy of anti-CD40, CpG and MPL in activation of mouse macrophages. **Molecular Immunology**, v. 66, p. 208-215, 2015.

SIMÕES, L. M. C., et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 59-65, 2004.

SILVA, V. G., et al. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, p. 1-7, 2013.

SZLISZKA, E., et al. Inhibition of Inflammatory Response by Artepillin C in Activated RAW264.7 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

TAIRA, J., NANBU, H., UEDA, K. Nitric oxide-scavenging compounds in *Agrimonia pilosa* Ledeb on LPS-induced RAW264.7 macrophages. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1221-1227, 2009.

TAKEUCHI, O., AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820, 2010.

TILLEQUIN, F. et al. Flavonoides de *Piper marginatum*. **Planta médica**, v. 33, p. 46-52, 1978.

VALLI, M. et al. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Química nova**, v. 35, n. 11, p. 2278-2287, 2012.

VERDI, L. G., BRIGHENTE, I. M. C., PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Econômicos E Biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

WANG, X. et al. Roles of T helper 17 cells and Interleukin-17 in neuroautoimmune diseases with emphasis on Multiple Sclerosis and Guillain-Barré syndrome as well as their animal models. **Journal of Neuroscience Research**, v. 91, p. 871-881, 2013.

WEINBLATT, M. E., et al. Head-to-Head comparison of subcutaneous Abatacept versus Adalimumab for rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 1, p. 28-38, 2013.

YAHAGI, T. et al. Inhibitory effect of chemical constituents from *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. on triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells and nitric oxide production in RAW 264.7 cells. **Journal of Natural Medicines**, v. 68, p. 414-420, 2014.

YOON, M. S. et al. Apigenin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: Implication of immunotherapeutic adjuvant. **Molecular Pharmacology**, v. 70, nº 3, 2006.

YU, C. C., et al. Abatacept in B7-1-Positive proteinuric kidney disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, ed. 25, p. 2416-2423, 2013.