

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO  
JEQUITINHONHA E MUCURI**

**VALÉRIA GOMES DE ALMEIDA**

**EFEITO CITOTÓXICO E POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE  
*Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R, M. King & H. Rob (ARNICA-  
DO-CAMPO) EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE  
PERIFÉRICO HUMANO, *IN VITRO***

**DIAMANTINA  
2012**

**VALÉRIA GOMES DE ALMEIDA**

**EFEITO CITOTÓXICO E POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE  
*Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R, M. King & H. Rob (ARNICA-  
DO-CAMPO) EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE  
PERIFÉRICO HUMANO, *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Área de concentração:** Farmacologia de produtos naturais e plantas medicinais.

**Orientador:** Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo - UFVJM

**Co-orientador:** Dr. Mauro Martins Teixeira - UFMG

**DIAMANTINA  
2012**

Ficha Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecária Viviane Pedrosa  
CRB6-2641

A447e Almeida, Valéria Gomes de  
2012 Efeito citotóxico e potencial anti-inflamatório de *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R. M. King & H. Rob (arnica-do-campo) em células mononucleares do sangue periférico humano, *in vitro*. – Diamantina: UFVJM, 2012.  
72 f.

Orientador: Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo  
Coorientador: Mauro Martins Teixeira

Dissertação (Mestrado - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. *Pseudobrickellia brasiliensis* 2. anti-inflamatório 3. citocinas 4. citometria de fluxo. I. Título.

**CDD 615**

*Aos meus pais, Aguinaldo e Rita,  
exemplo de amizade, respeito e dedicação incondicional,  
pela coragem e determinação com que conduziram  
os meus passos e dos meus irmãos,  
dedico este trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo cuidado, por colocar pessoas maravilhosas em minha vida e me conceder essa conquista.

Aos meus pais Aguinaldo e Rita e aos meus irmãos Renato e André por tudo que representam em minha vida, pelo apoio e confiança.

Aos meus filhos Arthur e Gustavo, fontes de amor, inspiração e força, por ainda tão pequenos terem suportado minhas ausências.

Ao meu marido Thyago, pela compreensão, auxílio, incentivo e carinho indispensáveis em todas as etapas desta busca pelo conhecimento.

A Mírian e Pollyana pelo apoio e amizade.

A Elisa e André pela acolhida fraternal em minhas temporadas fora de casa.

Aos companheiros do Laboratório de Imunologia, pelo auxílio e pelos momentos alegres que proporcionaram. Com certeza vocês tornaram tudo mais leve e agradável! Em especial, agradeço a Bethânia e Ulisses, pelo ombro amigo, colaboração e companheirismo.

Aos professores e colegas do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelo suporte.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, em especial a Adriana.

A Professora Cristiane F. F. Graef e Mércia Letice, pela confecção dos extratos, pela parceria e confiança.

A professora Etel Vieira, pela amizade e por toda atenção, tempo e dedicação prestados.

A professora Vanessa Amaral e ao professor Mauro Teixeira, pela prontidão em ajudar.

Ao meu orientador, professor Gustavo, exemplo de amizade, sabedoria e competência, pela oportunidade, compreensão e confiança nos momentos mais difíceis, pelos ensinamentos transmitidos e por contribuir para meu crescimento pessoal e profissional.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

*“É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia”*

Clarice Linspector

## RESUMO

A *Pseudobrickellia brasiliensis* (Asteraceae), conhecida como arnica-do-campo, é uma planta nativa da flora brasileira cuja preparação alcoólica tem sido utilizada como anti-inflamatório pela medicina popular. No entanto, os mecanismos biológicos envolvidos nessa atividade, ainda não foram devidamente elucidados. Nesse contexto, o presente estudo avaliou o potencial anti-inflamatório de *P. brasiliensis* através da análise da produção de citocinas anti e pró-inflamatórias por leucócitos mononucleares do sangue periférico. Foram utilizados extratos de *P. brasiliensis* após extração com os solventes Acetato de Etila (ACE) e Etanol (ETA), ambos diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO), bem como o extrato aquoso diluído em PBS (AQU). A citotoxicidade dos extratos, após 24h ou 5 dias de cultura celular, foi avaliada por meio da técnica de exclusão com Azul de Tripán e, tais resultados foram confirmados por meio de ensaios de apoptose e necrose, após marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo. No ensaio de inibição da produção de citocinas, Células Mononucleares do Sangue Periférico humano (PBMC) foram incubadas em meio de cultura, contendo Miristato-Acetato de Forbol (PMA) e Ionomicina como agentes estimuladores, na ausência ou presença do extrato AQU nas concentrações finais de 0,025 mg/mL, 0,05 mg/mL ou 0,1 mg/mL. Também, foi avaliado o efeito do extrato AQU sobre a resposta proliferativa de linfócitos ao estímulo mitogênico Fitohemaglutinina (PHA) como teste complementar na análise de ativação celular. De acordo com os dados obtidos, os extratos ACE e ETA apresentaram um alto grau de citotoxicidade, sendo, portanto excluídos das análises posteriores, que avaliaram o perfil de produção de citocinas e proliferação. O extrato AQU, além de não induzir apoptose e necrose, não demonstrou ação tóxica, mesmo após 5 dias de cultura. Nas culturas tratadas com AQU na concentração final de 0,1 mg/mL foi observada redução significativa da expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em resposta à estimulação com PMA e ionomicina. O efeito inibitório do extrato AQU, também, pode ser observado por meio da diminuição da resposta proliferativa de linfócitos ao PHA. Estes achados sugerem que o efeito anti-inflamatório atribuído à *P. brasiliensis* na medicina popular pode, pelo menos em parte, ser devido à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos, bem como da resposta proliferativa. Ensaios futuros, utilizando substâncias isoladas e identificadas a partir do extrato aquoso, são necessários para fortalecer os dados aqui apresentados e para demonstrar quais os mecanismos moleculares envolvidos nas ações inibitórias apresentadas no presente trabalho.

**Palavras-chave:** *Pseudobrickellia brasiliensis*, anti-inflamatório, citocinas, citometria de fluxo.

## ABSTRACT

*Pseudobrickellia brasiliensis* (Asteraceae), also known as “Arnica-do-Campo” is a native plant from Brazilian flora and its alcoholic preparation has been used as anti-inflammatory in folk medicine. However, the biological mechanisms involved in the anti-inflammatory activity are not well elucidated. In this context, the present study evaluated the anti-inflammatory potential of *P. brasiliensis* by performing an anti- and pro-inflammatory cytokine analysis on human peripheral blood leucocytes as well as cell activation, measured by proliferation assay. We used *P. brasiliensis* extracts utilizing different solvents including Ethyl Acetate (ACE) and ethanol (ETA), both diluted in dimethylsulfoxide (DMSO), and aqueous extract (AQU) diluted in PBS. After 24h or 5 days, *in vitro* cytotoxicity promoted by those extracts was evaluated using the exclusion technique with Trypan Blue. Furthermore, apoptosis and necrosis was measured by Annexin V-FITC and propidium iodide staining, after 4 hours of culture. For cytokine production inhibitory assay, humans Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were incubated in medium containing Phorbol Myristate Acetate (PMA) plus ionomycin as stimulating agents in the absence or presence of AQU extract at the final concentrations 0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml or 0.1 mg/ml. We also assessed, as a complementary test for cellular activation analysis, the effect of AQU extract on lymphocytes proliferative response after mitogenic stimulation with Phytohemagglutinin (PHA). According to the obtained data, ACE and ETA showed a high cytotoxicity rate and, therefore, they were not used in cytokine and proliferative analysis. The AQU extracts, besides not inducing apoptosis and necrosis, showed no toxic effects even after 5 days of culture. In cultures treated with AQU extract at final concentration of 0.1 mg / ml was observed a significant reduction in IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  expression in response to PMA stimulation. The AQU extract inhibitory effect can also be observed by the decrease of lymphocytes proliferative rate in response to PHA stimulation. These findings suggest that *P. brasiliensis* anti-inflammatory effect can be, at least in part, due PBMC pro-inflammatory cytokines inhibition as well as the proliferative response. Further assays, using aqueous extract isolated and identified substances are needed to strengthen the presented data and to demonstrate the molecular mechanisms involved in inhibitory actions reported in this study.

**Keywords:** *Pseudobrickellia brasiliensis*, anti-inflammatory, cytokine, flow cytometry.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	<i>Pseudobricketia brasiliensis</i> .....	18
Figura 2-	Resumo da participação de células e mediadores químicos no processo inflamatório.....	21
Figura 3-	Estratégia de análise da viabilidade celular por citometria de fluxo.....	32
Figura 4-	Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células viáveis (Anexina <sup>-</sup> PI), necróticas (Anexina <sup>-</sup> PI <sup>+</sup> ) ou apoptóticas (Anexina <sup>+</sup> PI <sup>+</sup> ), por citometria de fluxo.....	34
Figura 5-	Estratégia de análise do percentual de células positivas para citocinas por citometria de fluxo.....	36
Figura 6-	Sequência de procedimentos utilizados para as análises da intensidade média de fluorescência por citometria de fluxo.....	37
Figura 7-	Sequência de procedimentos utilizados para as análises de proliferação celular pela diluição do CFSE.....	39
Figura 8-	Percentual de PBMC viáveis nas culturas CON, DMSO e nas culturas ACE, ETA e AQU nas concentrações de 0,025, 0,05 e 0,1 mg/mL nos tempos de 24 horas e 5 dias.....	43
Figura 9-	Percentual de linfócitos viáveis, em necrose, em apoptose tardia e em apoptose recente das culturas CON, DMSO, ACE, ETA e AQU.....	44
Figura 10-	Análise do percentual de linfócitos-IFN- $\gamma^+$ , linfócitos-TNF- $\alpha^+$ e linfócitos-IL-10 <sup>+</sup> das culturas PMA, AQU 0,025 + PMA, AQU 0,05 + PMA e AQU 0,1 + PMA, após 4 h .....	46
Figura 11-	Análise da intensidade média de fluorescência (IMF) de linfócitos-IFN- $\gamma^+$ , linfócitos-TNF- $\alpha^+$ e linfócitos-IL-10 <sup>+</sup> das culturas PMA, AQU 0,025 + PMA, AQU 0,05 + PMA e AQU 0,1 + PMA, após 4 h .....	47
Figura 12-	Análise do percentual de linfócitos-IFN- $\gamma^+$ , linfócitos-TNF- $\alpha^+$ e linfócitos-IL-10 <sup>+</sup> das culturas PMA, AQU 0,025 + PMA, AQU 0,05 + PMA e AQU 0,1 + PMA, após 16 h.....	48
Figura 13-	Análise da intensidade média de fluorescência (IMF) de linfócitos-IFN- $\gamma^+$ , linfócitos-TNF- $\alpha^+$ e linfócitos-IL-10 <sup>+</sup> das culturas PMA, AQU 0,025 + PMA, AQU 0,05 + PMA e AQU 0,1 + PMA, após 16 h.....	49
Figura 14-	Análise do percentual de monócitos-TNF- $\alpha^+$ e monócitos-IL-10 <sup>+</sup> das culturas PMA, AQU 0,025 + PMA, AQU 0,05 + PMA e AQU 0,1 + PMA, após 4 h.....	51

Figura 15-	Análise da intensidade média de fluorescência de monócitos-TNF- $\alpha^+$ e monócitos-IL-10 $^+$ das culturas PMA, AQU 0,025 + PMA, AQU 0,05 + PMA e AQU 0,1 + PMA, após 4 h.....	52
Figura 16-	Análise do percentual de monócitos-TNF- $\alpha^+$ e monócitos-IL-10 $^+$ das culturas PMA, AQU 0,025 + PMA, AQU 0,05 + PMA e AQU 0,1 + PMA, após 16 h .....	53
Figura 17-	Análise da intensidade média de fluorescência de monócitos-TNF- $\alpha^+$ (A) e monócitos-IL-10 $^+$ (B) das culturas PMA, AQU 0,025 + PMA, AQU 0,05 + PMA e AQU 0,1 + PMA, após 16 h.....	54
Figura 18-	Índice de proliferação celular de linfócitos e das subpopulações linfocitárias CD4 $^+$ e CD8 $^+$ , estimulados com PHA na presença de salina ou do extrato aquoso de <i>P.brasiliensis</i> nas concentrações de, 0,025 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL .....	56
Figura 19-	Vias intracelulares envolvidas na síntese de citocinas pró-inflamatórias.....	61

## LISTA DE TABELAS

1 -	Sistemática da <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> .....	18
2 -	Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações linfocitárias e marcação de citocinas.....	29
3 -	Caracterização da amostra.....	41
4 -	Percentual de linfócitos positivos para as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-10 após 4 e 16 horas de cultura.....	45
5 -	Percentual de monócitos positivos para as citocinas TNF- $\alpha$ e IL-10 após 4 e 16 horas de cultura.....	50
6 -	Análise da atividade mitogênica do extrato aquoso de <i>P. brasiliensis</i> .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Extrato de <i>P. brasiliensis</i> em Acetato de Etila
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP- 1	Proteína ativadora 1
AQU	Extrato aquoso de <i>P. brasiliensis</i>
BSA	Bovine serum albumin
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl Ester
COX	Ciclooxigenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ETA	Extrato etanólico de <i>P. brasiliensis</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL-1	Fluorescência 1
FL-2	Fluorescência 2
FL-3	Fluorescência 3
FSC	Forward side scatter
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IMF	Intensidade média de fluorescência
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
IP	Índice de Proliferação
JAK	Janus Kinase
LOX	Lipooxigenase
MAP	Mitogen-activated protein
MEK	MAPK/ERK quinase
MHC	Complexo de Histocompatibilidade principal
MS	Ministério da Saúde
NCBI	National Lybrary of Medicine
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear $\kappa$ B

NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Tampão fosfato salina
PE	Ficoeritrina
PE-Cy5	Ficoeritrina-Cianina
PHA	Fitohemaglutinina
PI	Iodeto de propídeo
PKC	Proteína Quinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PMA	Miristato de Forbol Acetato
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
SSC	Side light scatter
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alpha
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	16
2.1	A utilização de plantas medicinais.....	16
2.2	A família Asteraceae .....	17
2.3	<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> .....	17
2.4	O processo inflamatório .....	20
3	JUSTIFICATIVA .....	24
4	OBJETIVOS.....	26
4.1	Objetivo geral .....	26
4.2	Objetivos Específicos .....	26
5	METODOLOGIA .....	27
5.1	Voluntários à doação de amostra biológica .....	27
5.2	Amostra biológica .....	27
5.3	Avaliação dos parâmetros hematológicos .....	28
5.4	Preparação dos extratos de <i>P. brasiliensis</i> .....	28
5.4.1	Identificação taxonômica .....	28
5.4.2	Coleta de folhas e preparo de extratos brutos .....	28
5.4.3	Diluição dos extratos .....	29
5.5	Anticorpos .....	29
5.6	Obtenção das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) .....	29
5.7	Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de <i>P. brasiliensis</i> sobre PBMC humanas, <i>in vitro</i> .....	30
5.7.1	Efeito dos extratos de <i>P. brasiliensis</i> sobre a viabilidade dos leucócitos .....	30
5.7.2	Ação dos extratos de <i>P. brasiliensis</i> sobre fenômenos apoptóticos e necróticos em PBMC humanas, <i>in vitro</i> .....	32
5.8	Avaliação do efeito do extrato aquoso de <i>P. brasiliensis</i> sobre produção de citocinas por PBMC, <i>in vitro</i> .....	33

5.9	Análise do efeito do extrato aquoso de <i>P. brasiliensis</i> sobre a proliferação de linfócitos humanos .....	37
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
7	RESULTADOS .....	41
7.1	Caracterização da amostra .....	41
7.2	Efeito dos extratos de <i>P. brasiliensis</i> sobre a viabilidade de PBMC humanas, <i>in vitro</i> .....	41
7.3	Efeito do extrato aquoso de <i>P. brasiliensis</i> sobre a expressão de citocinas em PBMC, <i>in vitro</i> .....	44
7.3.1	Avaliação do efeito indutor do extrato aquoso de <i>P. brasiliensis</i> sobre a expressão de citocinas em linfócitos do sangue periférico.....	45
7.3.2	Efeito do extrato aquoso de <i>P. brasiliensis</i> sobre a expressão de citocinas em linfócitos estimulados com PMA .....	45
7.3.3	Análise da indução de citocinas em monócitos do sangue periférico estimulados com extrato aquoso de <i>P. brasiliensis</i> .....	49
7.3.4	Efeito do extrato aquoso de <i>P. brasiliensis</i> sobre a expressão de citocinas em monócitos estimulados com PMA.....	50
7.4	Avaliação da proliferação celular em linfócitos e nas subpopulações linfocitárias TCD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> tratados com extrato aquoso de <i>P. brasiliensis</i> .....	54
7.4.1	Efeito indutor do extrato aquoso de <i>P. brasiliensis</i> sobre a proliferação de linfócitos .....	55
7.4.2	Efeito do extrato aquoso de <i>P. brasiliensis</i> sobre a proliferação de linfócitos estimulados .....	55
8	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	57
9	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS .....	63
	ANEXO A.....	70
	ANEXO B.....	72





# 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento popular acerca de plantas medicinais foi acumulado e transmitido por sucessivas gerações, originando uma rica cultura que mantém esta prática conservada até os dias de hoje em muitas comunidades. A utilização de plantas medicinais desperta o interesse de pesquisadores em elucidar suas atividades biológicas, uma vez que, além enriquecer o conhecimento sobre a flora mundial, as plantas constituem importante fonte de obtenção de novos fármacos e insumos farmacêuticos.

A família Asteraceae é rica em espécies que apresentam importância econômica e medicinal. Entre as espécies nativas da flora brasileira encontra-se a *P. brasiliensis* (Spreng) R. M. King & H. Rob., uma planta que tem sido utilizada na medicina popular para fins medicamentosos, sendo atribuídas a ela ações anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante. Porém, a literatura carece de dados que comprovem sua eficácia e segurança para utilização como fitoterápico. Estudos prévios, realizados no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, demonstraram que o extrato etanólico de *P. brasiliensis* inibe a expressão da citocina Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) em leucócitos estimulados *in vitro*. Diante disso, partimos para uma investigação mais detalhada sobre a toxicidade dos extratos aquoso, etanólico e em Acetato de Etila da *P. brasiliensis* em diferentes concentrações e tempos de cultura. Em seguida, avaliamos o efeito inibitório dessa espécie sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias e sobre a proliferação de leucócitos estimulados.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A utilização de plantas medicinais

O uso de plantas com fins terapêuticos pelo homem é uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como planta medicinal "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos" (OMS, 1998).

Dados da OMS apontam que cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta medicinal na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (OMS, 2002). A utilização de plantas com fins medicinais baseia-se no conhecimento popular e nas informações verbais transmitidas a partir de experiências particulares (MACIEL *et al.*, 2002), o que resultou em uma rica cultura popular acerca de plantas medicinais preservada em diversas comunidades em todo o mundo.

Muitas espécies vegetais são utilizadas empiricamente, sem respaldo científico quanto a sua eficácia e segurança (TACHJIAN *et al.*, 2010). No entanto, o uso inadequado de plantas medicinais, assim como qualquer outro medicamento alopático, pode levar à ocorrência de efeitos indesejáveis, muitas vezes graves, principalmente com o uso concomitante de outros fármacos, ou até mesmo de outros fitoterápicos (CORDEIRO *et al.*, 2005; YILMAZ *et al.*, 2007).

O conhecimento popular e a utilização de plantas para fins medicinais fornecem indícios sobre a atividade farmacológica de muitas espécies, despertando o interesse de pesquisadores e indústrias farmacêuticas (BALUNAS; KINGHORN, 2005). O processo de descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco é longo, complexo, caro e de alto risco, sendo dividido em duas grandes fases: a fase de descoberta (pré-clínica ou pesquisa básica) e a fase de desenvolvimento (ou clínica) (LOMBARDINO; LOWE, 2004). Newman e Gragg (2007), em uma revisão recente, analisaram todas as drogas lançadas entre 1981 e 2006 demonstrando que os produtos naturais constituem uma importante fonte de novas estruturas.

Apesar da disponibilidade de tecnologia e estratégia suficiente para a obtenção de fármacos derivados exclusivamente da síntese química, produtos naturais e, particularmente,

plantas medicinais, continuam a ser importante fonte de novos fármacos e constituintes químicos, tendo em vista a utilização de princípios ativos como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e matéria prima farmacêutica (BALUNAS; KINGHORN, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2008). Nesse contexto, dentre os medicamentos atualmente utilizados na clínica médica, 25% são produtos derivados de plantas (PHILLIPSON, 2007).

## 2.2 A família Asteraceae

A família Asteraceae, constituída por cerca de 1.600 gêneros, que incluem 23.000 espécies distribuídas pelas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, particularmente na América do Sul (CANCELLI *et al.*, 2007), possui várias espécies que apresentam constituintes bioativos. No entanto, a maior parte dessas espécies ainda não foram submetidas à investigação química e de bioprospecção (HIND; BEENTJE, 1996). A família Asteraceae é ainda uma família rica em espécies com importância econômica, sendo muitas delas utilizadas como plantas ornamentais ou medicinais (BREMER, 1994). Plantas dessa família têm sido extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica (VERDI *et al.*, 2005), sendo os compostos fenólicos e os terpenóides umas das classes de moléculas mais investigadas por apresentarem potencial farmacológico (MUNOZ-SUANO *et al.*, 2009; VITALINI *et al.*, 2011). Algumas plantas desta família tem demonstrado ação anti-inflamatória, dentre as quais podemos citar: a arnica-da-serra (*Lychnophora passerina* (Mart. ex DC) Gardn), guaco (*Mikania glomerata* Spreng.), calêndula (*Calendula officinalis* L.), camomila (*Matricaria recutita* L.) e marcela (*Archyrocline satureioides* (Lam.) DC) (CAPELARI-OLIVEIRA *et al.*, 2011; FIERRO *et al.*, 1999; SARTORI *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 1988), entre outras.

## 2.3 *Pseudobrickellia brasiliensis*

Também conhecida como arnica-do-campo ou arnica-do-mato, a *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R, M. King & H. Rob., é uma Asteraceae nativa da flora brasileira pertencente à tribo Eupatorieae, que tem sido popularmente utilizada para fins medicinais

(RIBEIRO *et al.*, 2001). A planta, encontrada nos estados de Minas Gerais, Goiás, Bahia, São Paulo, Pernambuco e Distrito Federal é um subarbusto, medindo em torno de 1,3 m de altura. Suas folhas são simples, alternas, densamente espiraladas e sésseis. Possui capítulos discóides, pendunculados, em corimbo e suas flores são da cor amarelo creme, monóclinas e com corola tubulosa (HATTORI; NAKAJIMA, 2008) (FIG. 1). A sistemática da *P. brasiliensis* está indicada na TAB. 1.



**FIGURA 1** - *Pseudobrickellia brasiliensis*.

**TABELA 1-** Sistemática da *Pseudobrickellia brasiliensis*

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordem	Asterales
Família	Asteraceae
Tribo	Eupatorieae
Gênero	<i>Pseudobrickellia</i>
Espécie	<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>

Foi demonstrado por Bohlmann *et al.* (1984), que a *P. brasiliensis* apresenta como constituintes químicos triterpenos e sesquiterpenos, tais como hidroxigermacreno, lupeol e seu isômero, acetato de  $\beta$ -amirina, espatulenol, cadineno, cadinol, oplopanona, acetato de  $\alpha$ -acetoxi- $\beta$ -amirina. Na medicina popular a *P. brasiliensis* mantida em álcool é utilizada como anti-inflamatório, cicatrizante e analgésico (CARNEIRO, 2009; REIS; BELLINI, 2007; SOUZA, 2006). No entanto, os mecanismos envolvidos nas atividades atribuídas à planta, ainda não foram devidamente elucidados. Em levantamento bibliográfico recente, utilizando-se ferramentas de busca digital da “National Lybrary of Medicine” (NCBI/NIH), não foram encontrados registros, acerca dos mecanismos de bioatividade atribuídos a essa espécie ou de outros exemplares do mesmo gênero, tais como *P. angustissima* (Spreng. ex Baker) R.M.King & H.Rob, *P. irwinii* R.M.King & H.Rob, *P. rosanae* J.N. Nakajima e *P. piniflora* A.Gray.

A tribo Eupatorieae é constituída por vários gêneros com espécies que apresentam atividades medicinais, como a *Ageratum conyzoides* L., que apresenta atividade antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária e antiinflamatória (NOUR *et al.*, 2010; OKUNADE, 2002) e a *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King et H. Rob. que possui propriedades analgésica e anti-inflamatória (DEL-VECHIO-VIEIRA *et al.*, 2009). Dentro da tribo Eupatorieae, destaca-se, ainda, o gênero *Mikania*, que contém diferentes espécies com a denominação popular de guaco (BUDEL *et al.*, 2009), das quais podemos citar *M. involucrata* Hook. et Arn. e *M. hirsutissima* DC., com atividade anti-inflamatória (SUYENAGA *et al.*, 2002).

Tendo em vista a utilização da *P. brasiliensis* sem respaldo científico quanto à sua real eficácia como planta medicinal antiinflamatória, torna-se necessária uma avaliação criteriosa dessa possível atividade biológica. No entanto, sabe-se que o processo inflamatório é um complexo evento multifatorial que envolve moléculas solúveis produzidas e secretadas por células hepáticas, leucócitos e células endoteliais, bem como a ativação de vias enzimáticas associadas à membrana celular e interações intercelulares que potencializam as funções efetoras de células-chaves para o desenvolvimento ou manutenção da inflamação. Na seção seguinte, alguns desses elementos serão apresentados de maneira mais detalhada para que possamos ter uma maior clareza dos objetivos do estudo ora proposto.

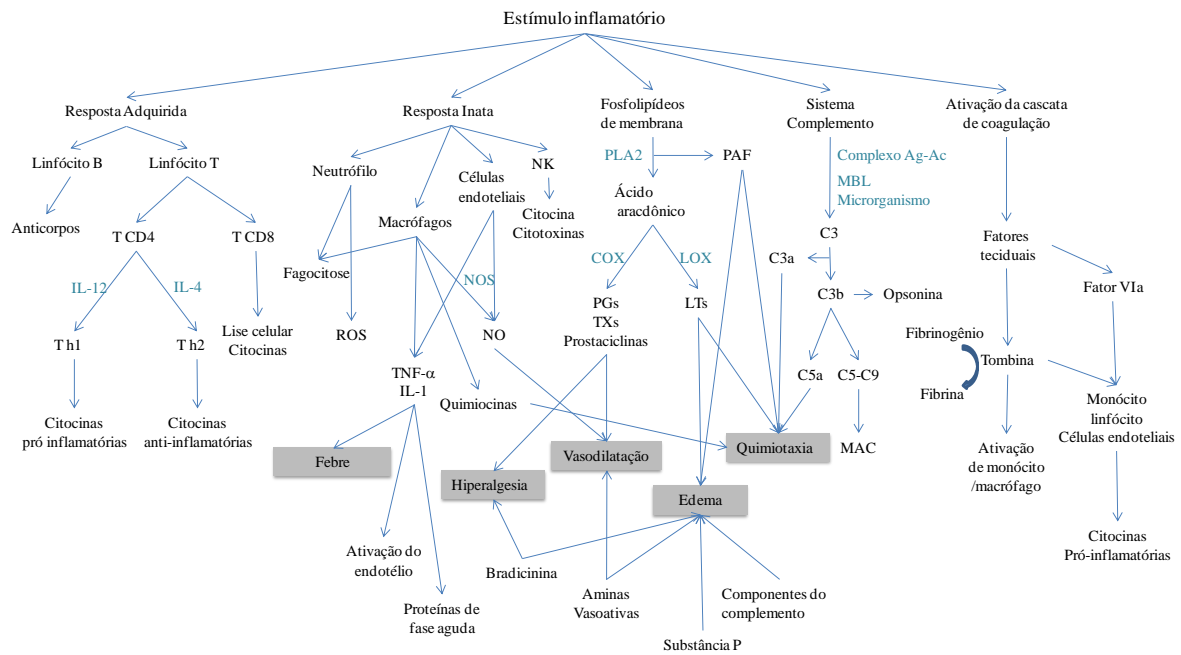
## 2.4 O processo inflamatório

O processo inflamatório consiste em uma resposta fisiológica frente a um agente infeccioso, um antígeno ou uma lesão tecidual e envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido afetado (TILLEY *et al.*, 2001). O objetivo da inflamação é a proteção tecidual, eliminação do agente agressor e o reparo da área afetada, retornando em seguida ao estado de homeostasia. Uma resposta inflamatória aguda geralmente é benéfica, porém, a inflamação crônica é prejudicial, podendo promover efeitos deletérios (SCHETTER *et al.*, 2010).

Os sinais clínicos característicos da inflamação aguda, descritos por Celsius a mais de 2.000 anos atrás compreendem: calor, dor, rubor e edema. Posteriormente, Virchow incluiu a perda da função como um quinto sinal da inflamação (MEDZHITOV, 2010).

Os sinais clínicos descritos por Celsius refletem as alterações hemodinâmicas e celulares que ocorrem no local afetado, que incluem o aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação arteriolar e migração celular. Essas alterações são reguladas pela ação de diferentes mediadores liberados em resposta ao estímulo inflamatório. Tais mediadores, que orquestram o processo inflamatório, são em grande parte fatores protéicos, presentes no plasma ou produzidos e liberados por células endoteliais, leucócitos infiltrados no sítio inflamatório ou por células residentes, e incluem as quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanóides e produtos da cascata proteolítica do sistema complemento (MEDZHITOV, 2008; MEDZHITOV, 2010) (FIG. 2). Tendo em vista a importância dos mediadores químicos em coordenar a resposta inflamatória; substâncias que interfiram na síntese e/ou ação de tais moléculas apresentam-se como agentes com potencial farmacológico e candidatos a novos fármacos.

A maioria das pesquisas sobre a atividade antiinflamatória de plantas medicinais investiga os eventos que levam à produção dos mediadores lipídicos, através da modulação ou inibição da atividade de enzimas da via do ácido aracônico, tais como as ciclooxigenases (COX), lipooxigenase (LOX) e fosfolipase A2 (PLA2) (AHN *et al.*, 2005; EMAMI, *et al.*, 2010; HAMBURGER, 2002; LEUNG *et al.*, 2005).



**FIGURA 2** - Resumo da participação de células e mediadores químicos no processo inflamatório (adaptado de SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A inibição das enzimas COX e, portanto, a inibição da síntese dos prostanóides, é um mecanismo bastante conhecido e constitui o mecanismo de ação dos fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). Os AINES estão entre os medicamentos mais comumente utilizados em todo o mundo, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos, embora possam levar a ocorrência de sérios efeitos adversos (FILARETOVA *et al.*, 2011). Já os anti-inflamatórios esteroidais, ou glicocorticóides, que são potentes anti-inflamatórios e imunossupressores, atuam através de uma ação direta e indireta sobre a transcrição gênica, ou por mecanismos não genômicos, podendo inibir a expressão de citocinas, receptores de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, COX2, óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e outras proteínas envolvidas no processo inflamatório (RHEN; CIDLOWSKI, 2005).

A produção de citocinas constitui importante evento no processo de instauração e manutenção do processo inflamatório, bem como no direcionamento de outras respostas imunológicas. As citocinas estão envolvidas em praticamente todas as etapas da inflamação. São elas que determinam se a resposta se desenvolve e, subsequentemente, se a resposta será predominantemente citotóxica, humoral, mediada por células ou alérgica. De maneira interessante, as citocinas podem, em determinado grau, participar da resolução da inflamação ou mesmo da sua regulação (BORISH; STEINKE, 2003; KUSHNER, 1998; LI *et al.*, 2006).

A inibição de uma única citocina, frequentemente, terá efeito limitante sobre a resposta inflamatória global (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). De acordo com sua ação, as citocinas podem ser classificadas como antiinflamatórias, pró-inflamatórias ou reguladoras. As citocinas pró-inflamatórias são polipeptídios produzidos por diversos tipos celulares, especialmente pelos leucócitos mononucleares, após a ativação de diferentes vias metabólicas intracelulares, com destaque para as vias JAK/STAT, MEK/ERK, as proteínas Jun/Fos, conhecido como AP1, e o NF- $\kappa$ B (WAGNER, 2010; PFEFFER, 2011; ZENZ *et al.*, 2008). Essas citocinas desempenham diferentes papéis na resposta inflamatória, incluindo a ativação de células endoteliais e leucocitárias, promovendo assim a indução da resposta de fase aguda. As principais citocinas mediadoras da resposta inflamatória aguda são o fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) (MEDZHITOV, 2008). Ao interagirem com seus respectivos receptores, IL-1 e TNF- $\alpha$  ativam vias de sinalização intracelulares, resultando na ativação dos fatores de transcrição intracelulares AP1 e NF- $\kappa$ B, que por sua vez, modulam a transcrição gênica de várias proteínas inflamatórias (KAMINSKA, 2005). O TNF- $\alpha$  é produzido principalmente por macrófagos e favorece o recrutamento de leucócitos para o tecido afetado por estimular a expressão de moléculas de adesão no endotélio e a secreção de quimiocinas por macrófagos e células endoteliais (APOSTOLAKI *et al.*, 2010; KIM e DEUTSCHMAN, 2000; WAJANT, 2009). Nas fases mais tardias da inflamação, os linfócitos T também contribuem significativamente para a síntese dessas citocinas. Tais linfócitos são subclassificados em duas grandes populações, com base na expressão de moléculas de superfície, em linfócitos T CD4<sup>+</sup> (linfócitos auxiliares) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (linfócitos citotóxicos). Após a ativação antigênica, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> em repouso, também chamados linfócitos T helper (Th0), sofrem um processo de expansão clonal (proliferação) e se diferenciam em células efetoras Th1, Th2, Treg ou Th17, que sintetizam diferentes padrões de citocinas, o que lhes confere papéis distintos na resposta imunológica (CHEN *et al.*, 2011; MOSMANN *et al.*, 1986; WEAVER *et al.*, 2006). Os linfócitos Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, enquanto as células Th2 secretam citocinas antiinflamatórias tais como IL-4 e IL-5 (MCCOY *et al.*, 2010). O balanço entre os padrões de produção de citocinas é que estabelecerá um ambiente pró ou anti-inflamatório. O IFN- $\gamma$  liberado por linfócitos Th1 ativa macrófagos e células *natural killer* (NK) e, em monócitos e macrófagos, o IFN- $\gamma$  estimula a síntese de TNF- $\alpha$  (LEVY; GARCIA-SASTRE, 2001; YAMAUCHI *et al.*, 1997). Além disso,



IFN- $\gamma$  regula a expressão de MHC classe I e II e a apresentação de antígenos (MAEYER-GUINARD, 1992).

Tendo em vista a participação das citocinas no direcionamento da resposta imunológica e da ativação de leucócitos mononucleares, fundamentais para o desenvolvimento/manutenção da resposta inflamatória, a identificação de produtos naturais, capazes de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias e/ou estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias (AVELAR *et al.*, 2011; CAPELARI-OLIVEIRA *et al.*, 2011; PREETHI *et al.*, 2009) representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de fármacos com ação antiinflamatória e imunossupressora.

### 3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, as autoridades mundiais em saúde têm dirigido as atenções para o uso de plantas medicinais e fitoterápicos. No Brasil, em 2006, foi implantada no Sistema Único de Saúde (SUS) a “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares” (PNPIC) (Portaria MS nº 971, de 03/05/2006) que contempla diretrizes, ações e responsabilidades do governo federal, estadual e municipal para a oferta de serviços do SUS, incluindo a fitoterapia. Nesse mesmo ano, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária formulou a “Política Nacional de Medicamentos Fitoterápicos” (Decreto Presidencial nº 5.813, de 22/06/2006), com diretrizes que vão além das esferas do setor de Saúde, englobando toda a cadeia produtiva de plantas medicinais e produtos fitoterápicos. Em 2010, a Portaria MS nº 886, de 20/04/2010 instituiu a Farmácia Viva no SUS, que, no contexto da Política Nacional de Assistência Farmacêutica, visa atender à população com a fitoterapia, promovendo o resgate e a valorização da cultura popular no que se refere à utilização de plantas medicinais, com a introdução de conhecimentos científicos.

A *P. brasiliensis*, uma planta encontrada na Serra do Espinhaço no Estado de Minas Gerais (ALMEIDA *et al.*, 2004; VIANA; LOMBARDI, 2007), tem sido utilizada na medicina popular como anti-inflamatória, cicatrizante e analgésica (CARNEIRO, 2009; REIS *et al.*, 2007; SANTOS, 2002), porém, não há relatos científicos sobre sua eficácia e toxicidade. Como prática comum aos estudos de qualquer espécie vegetal utilizada para fins medicinais, a análise de toxicidade da planta é tão importante quanto a comprovação da ação biológica que se deseja demonstrar. A avaliação dos possíveis riscos biológicos é fundamental para julgar como viável ou não a continuidade dos estudos com a espécie. Tendo a toxicidade como uma das nossas primeiras preocupações, propusemos realizar os ensaios de toxicidade que serão apresentados mais adiante.

Uma vez que a *P. brasiliensis* é utilizada como anti-inflamatório, hipotetizamos que os diferentes extratos desta espécie poderiam estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias e/ou inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias em diferentes populações e subpopulações leucocitárias. Estudos preliminares conduzidos no Laboratório de Imunologia da UFVJM demonstraram que o extrato etanólico de *P. brasiliensis* apresentava efeito inibitório sobre a produção de IFN- $\gamma$  em leucócitos estimulados por Miristato de Forbol Acetato (PMA) (COSTA *et al.*, 2008). No entanto, a toxicidade desse extrato não havia sido

avaliada. No presente trabalho, propõe-se aprofundar os estudos iniciados anteriormente, realizando uma análise mais detalhada de diferentes extratos de *P. brasiliensis* e a ação dos mesmos sobre parâmetros imunológicos importantes no desenvolvimento ou contenção da resposta inflamatória, tais como o perfil de citocinas afetadas e as populações celulares envolvidas. Acredita-se que o estudo de tais fenômenos imunológicos possa corroborar o uso popular da *P. brasiliensis* e contribuir para o conhecimento da tão diversificada e ainda pouco conhecida flora medicinal brasileira.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito citotóxico e o potencial anti-inflamatório de *P. brasiliensis* por meio da sua ação sobre a produção de citocinas envolvidas no processo de manutenção ou contenção do processo inflamatório.

### **4.2 Objetivos específicos**

Verificar a indução de morte celular em leucócitos do sangue periférico pelos extratos de *P. brasiliensis*;

Analisar o efeito dos extratos de *P. brasiliensis* sobre a produção de citocinas em populações leucocitárias;

Determinar o efeito dos extratos de *P. brasiliensis* sobre a proliferação de leucócitos humanos.

## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 Voluntários à doação de amostra biológica**

Participaram do presente trabalho voluntários saudáveis, com idade compreendida entre 18 e 39 anos, que não reportaram doença infecciosa, autoimune, crônico degenerativa ou de hipersensibilidade e que não estavam fazendo uso de medicamentos com ação antiinflamatória. Todos os indivíduos que participaram deste estudo, após serem esclarecidas dos objetivos da pesquisa, deram seu consentimento (Anexo A). O presente projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da UFVJM sob o registro n° 002/09.

Os procedimentos experimentais descritos a seguir foram realizados no laboratório de Imunologia da UFVJM.

### **5.2 Amostra biológica**

A amostra biológica constituiu de 10 mL de sangue venoso, coletado por punção da veia antecubital mediana, na fossa antecubital, utilizando tubos vacuntainer contendo heparina como anticoagulante. Os procedimentos de coleta foram conduzidos por pessoal treinado e capacitado para tal procedimento e obedeceram as Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso (2010). Após a utilização da amostra biológica nas análises descritas a seguir, todo o material remanescente foi descartado ou estocado por tempo suficiente para repetição dos experimentos, quando necessário.

### **5.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos**

Para obtenção dos valores de leucócitos totais foi utilizado o contador automático de células CELM CC-550® (CELM, Barueri, SP, Brasil). A contagem relativa das diferentes populações leucocitárias (contagem diferencial) foi realizada pela observação em microscópio óptico do esfregaço sanguíneo, após coloração com Geimsa e May-Grunwald, conforme descrito em Vallada (1999).

### **5.4 Preparação dos extratos de *P. brasiliensis***

#### **5.4.1 Identificação taxonômica**

Amostras de *Pseudobrickellia brasiliensis*, contendo flores, foram coletadas no Campus Juscelino Kubitschek da UFVJM, em Diamantina-MG. A identificação botânica foi realizada no Herbário DIA/UFVJM, onde as excicatas foram depositadas sob o número de registro 1296.

#### **5.4.2 Coleta de folhas e preparo de extratos brutos**

Folhas de um espécime adulto de *P. brasiliensis* foram coletadas no período matutino (horas de temperatura mais baixa e menor insolação) do dia 21 de abril de 2010, em dia não chuvoso no Campus Juscelino Kubitschek da UFVJM, em Diamantina-Minas Gerais. Após a coleta, as folhas dissecadas em bancada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar direta. O material coletado foi seco à temperatura ambiente até atingir peso constante. Em seguida as folhas foram rasuradas, armazenadas em recipientes de vidro âmbar e maceradas sequencialmente em Acetato de Etila, Etanol e água. Ao término da maceração, os extratos Acetato de Etila (ACE) e etanólico (ETA) foram filtrados e concentrados em rotaevaporador (40-42° C, sob pressão reduzida). Já o extrato aquoso (AQU) foi filtrado, liofilizado e congelado.

### 5.4.3 Diluição dos extratos

Os extratos de *P. brasiliensis* foram fornecidos pelo Laboratório de Fitoquímica/UFVJM, sob responsabilidade da Dra. Cristiane Fernanda Fuzer Graef. Os extratos ACE e ETA foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) e o extrato AQU em tampão fosfato salina (PBS 0,015 M pH 7,4) nas concentrações de 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL.

### 5.5 Anticorpos

Para identificação das subpopulações linfocitárias e marcação das citocinas intracitoplasmáticas, por citometria de fluxo, foram utilizados anticorpos monoclonais específicos e marcados com fluorocromos, conforme demonstrado na TAB. 2.

**TABELA 2** - Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações linfocitárias e marcação de citocinas.

Anticorpos monoclonais	Especificidade	Marca	Clone
Anti-CD4 humano marcado com PE-Cy5 <sup>1</sup>	Subpopulação de Linfócitos T-CD4	BD Bioscience	RPA-T4
Anti-CD8 humano marcado com PE-Cy5	Subpopulação de Linfócitos T-CD8	BD Bioscience	RPA-T8
Anti-CD3 biotilado	População de linfócitos T	BD Bioscience	HIT3a
Estreptavidina marcada com PE <sup>2</sup>	..	BD Pharmigen	..
Anti-IFN- $\gamma$ humano marcado com PE	Interferon- $\gamma$	Biolegend	45.B3
Anti-TNF- $\alpha$ humano marcado com PE	Fator de necrose tumoral- $\alpha$	Biolegend	MAb11
Anti-IL-10 humano marcado com PE	Interleucina-10	Biolegend	JES3-9D7

<sup>1</sup>PE-Cy5: Ficoeritrina-Cianina

<sup>2</sup>PE: Ficoeritrina

### 5.6 Obtenção das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)

As PBMC foram obtidas a partir de 10mL de sangue periférico venoso após centrifugação em Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA) conforme descrito por

Bicalho *et al.* (1981). O anel de PBMC, formado após a centrifugação, foi recolhido e lavado 2 vezes em PBS (200 g, 4°C, 10 min). O precipitado de células foi em seguida ressuspenso em 1 mL de PBS/BSA 1% ou meio de cultura RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Após contagem das células em câmara hemacitométrica de Neubauer, as células foram novamente centrifugadas e ressuspenso em PBS/BSA 1% ou RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado com L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, USA) (2 mM), e coquetel antibiótico/antimicótico (penicilina G 100UI/mL, estreptomicina 100µg/mL e anfotericina B 250 ng/mL - Sigma, St. Louis, MO, USA), na concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL.

## **5.7 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de *P. brasiliensis* sobre PBMC humanas, *in vitro***

### **5.7.1 Efeito dos extratos de *P. brasiliensis* sobre a viabilidade dos leucócitos**

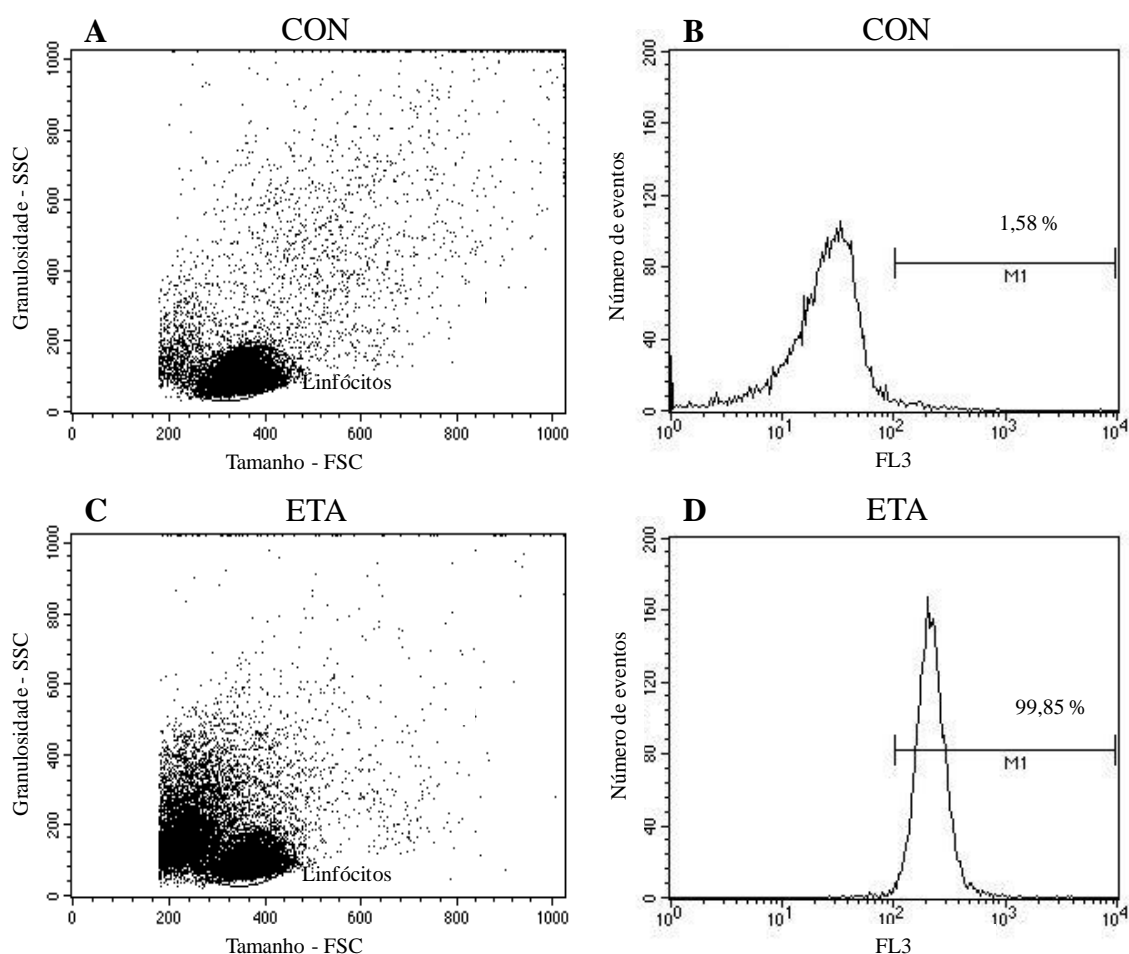
A fim de verificar se os extratos de *P. brasiliensis* causariam prejuízo às células após 24 horas e 5 dias de cultura, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pela exclusão com Azul de Tripán. Esse corante permite a avaliação da viabilidade celular através da perda da integridade da membrana citoplasmática, por penetrar apenas em células que apresentem poros na membrana celular (KIM *et al.*, 2011).

Para a realização deste teste, um volume de 50 µL de suspensão celular (cerca de  $5 \times 10^5$  células) (n=4) foi incubado em meio contendo RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) acrescido de L-glutamina (2mM), soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) (10%), e coquetel antibiótico/antimicótico (penicilina G 100UI/mL, estreptomicina 100µg/mL e anfotericina B 250 ng/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA) o que denominamos de RPMI completo, na ausência (CON) ou presença de 50 µL de um dos extratos ACE, ETA ou AQU, nas concentrações de 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL, o que correspondeu às concentrações finais de 0,025 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente. As culturas controle do solvente receberam igual volume de DMSO. As culturas foram realizadas em placa de 24 poços em duplicata e cada replicata foi reservada para análise após 24 h ou 5 dias de cultura a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Após o período de incubação as células foram removidas da placa por lavagem com 2 mL de PBS



gelado, transferidas para tubo de fundo redondo 5 mL e centrifugadas (200 g, 4° C, 10 min). A viabilidade das suspensões celulares foi avaliada através da citometria de fluxo (FACScan® - Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) após incubação de 10 µL das suspensões celulares com 190 µL azul de tripan a 0,002% por 5 min, seguido de aquisição de pelo menos 10000 eventos, dentro de uma região (*gate*) correspondente às células de interesse.

Para avaliação da viabilidade celular por citometria, utilizou-se o programa específico de análise de dados Cell-Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A estratégia de análise consistiu, primeiramente, na seleção da população linfocitária pela análise de gráficos de distribuição pontual em função do tamanho (FSC – *forward side scatter*) e granulosidade (SSC – *side light scatter*) celulares (FIG. 3A). Em seguida, utilizaram-se histogramas em escala logarítmica, de intensidade de fluorescência-3 (FL-3) em função do número de células, a fim de determinar o percentual de células positivas para marcação com Azul de Tripan. Para isso, foi estabelecido um limiar de negatividade em função da curva de fluorescência obtida para o grupo controle (M1, FIG. 3B). O mesmo marcador foi empregado para as demais situações experimentais para obter os valores percentuais de células fluorescentes positivas (FIG. 3C). Vale ressaltar que a análise de viabilidade celular por citometria de fluxo, após a marcação com Azul de Tripan, foi padronizada em nosso laboratório e está em vias de publicação.



**FIGURA 3** - Estratégia de análise da viabilidade celular por citometria de fluxo. A e C - seleção da população linfocitária utilizando os parâmetros de tamanho (FSC) e granulidade (SSC). B - histograma representando o percentual de células fluorescentes positivas nas culturas CON. D - histograma representando o percentual de células positivas após incubação com extrato ETA de *P. brasiliensis*.

### 5.7.2 Ação dos extratos de *P. brasiliensis* sobre fenômenos apoptóticos e necróticos em PBMC humanas, *in vitro*

Foram realizados testes adicionais de avaliação da indução de morte celular na presença dos extratos de *P. brasiliensis*, *in vitro*, por meio da utilização dos marcadores Anexina V e Iodeto de Propídeo (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II - BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA). Esse é um método sensível amplamente utilizado para detectar a perda da viabilidade celular, *in vitro*, permitindo determinar de maneira específica se as células são viáveis, apoptóticas ou necróticas (VERMES *et al.*, 2000).

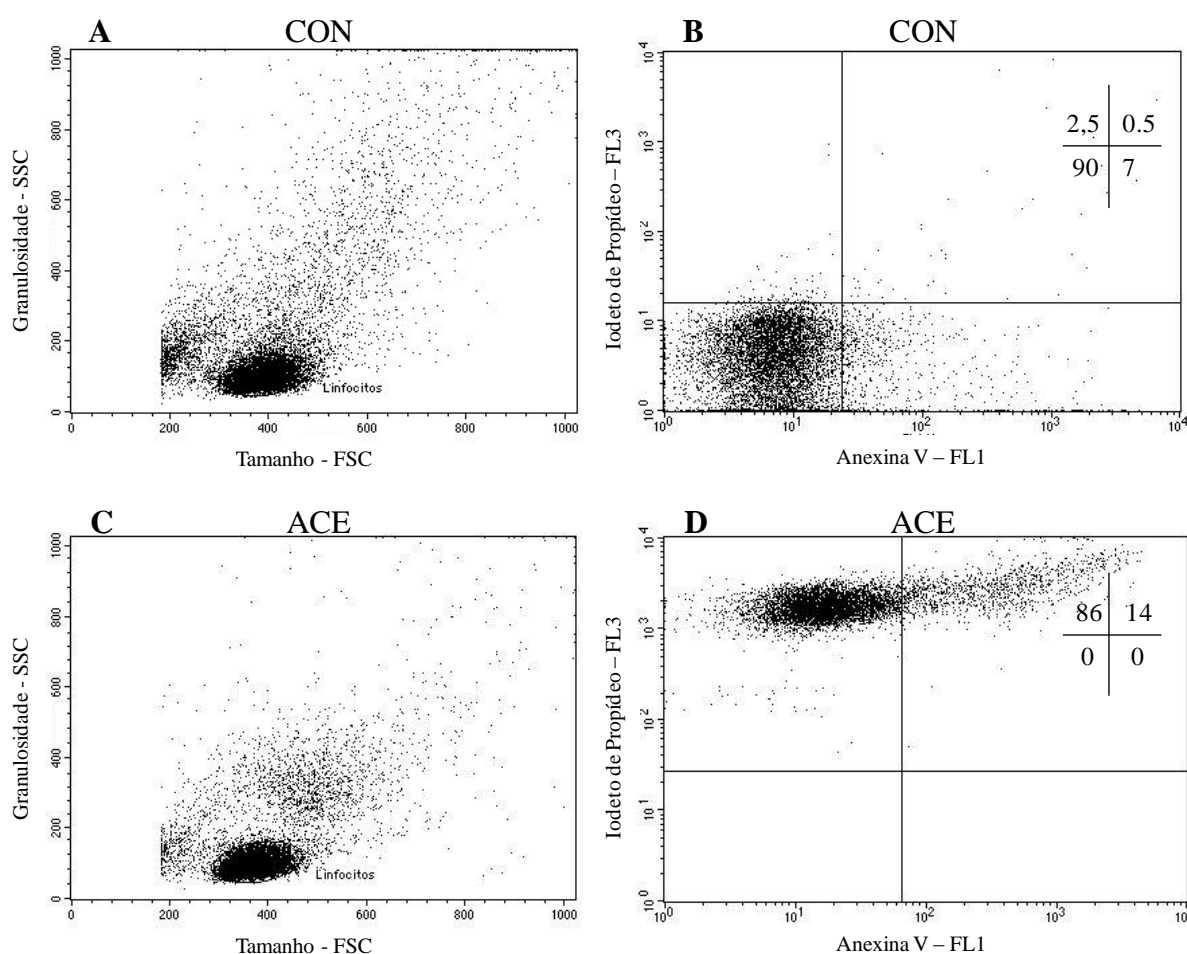
Em tubos de fundo redondo de 5mL, cerca de  $5 \times 10^5$  PBMC de oito indivíduos

foram incubadas em meio de cultura contendo RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) acrescidas ou não de 50  $\mu$ L dos extratos ACE, ETA ou AQU na concentração final de 0,05 mg/mL. As culturas controle do solvente receberam igual volume de DMSO. As culturas permaneceram por 4 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após duas lavagens por centrifugação (200 g, 4°C, 10 min) com 2 mL PBS gelado, o precipitado celular foi ressuspensão em 100  $\mu$ L de *Biding buffer* (que acompanha o quite). Em seguida, as células foram incubadas com 2  $\mu$ L de Anexina V-FITC e 2  $\mu$ L de Iodeto de Propídeo (PI) por 15 min à 25°C e ao abrigo da luz e, posteriormente, submetidas a aquisição dos dados por citometria de fluxo (FACScan® - Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) até 1 h após a marcação, procedendo-se a aquisição de 20.000 eventos, dentro de uma região de interesse. A marcação simultânea com Anexina-V e PI permite determinar a frequência de células viáveis (Anexina<sup>-</sup> PI<sup>-</sup>), em apoptose recente (Anexina<sup>+</sup> PI<sup>-</sup>), em apoptose tardia (Anexina<sup>+</sup> PI<sup>+</sup>) e em necrose (Anexina<sup>-</sup> PI<sup>+</sup>).

A determinação do valor percentual de células marcadas com anexina e/ou PI foi realizada utilizando-se o programa Cell-Quest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A FIG. 4 mostra de forma esquemática, a sequência de procedimentos adotados para a análise dos dados obtidos pela citometria de fluxo. Inicialmente, foi identificada a população de linfócitos em gráficos de distribuição pontual definida pelos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (FIG. 4A E 4C). Em seguida, foi feita a análise de intensidade de fluorescência apresentada pelas células presentes nesta região em gráficos de distribuição pontual de fluorescência 1 (FL-1) *versus* fluorescência 3 (FL-3) (FIG. 4B e 4D).

### **5.8 Avaliação do efeito do extrato aquoso de *P. brasiliensis* sobre produção de citocinas por PBMC, *in vitro***

A análise do perfil de produção de citocinas em populações leucocitárias consistiu em duas estratégias distintas: na primeira, denominada ensaio de ativação, investigou-se a capacidade do extrato AQU em estimular a produção de citocinas pelos leucócitos; e na segunda, denominada ensaio de inibição, avaliou-se a capacidade do extrato em inibir a síntese de citocinas pelos leucócitos periféricos.



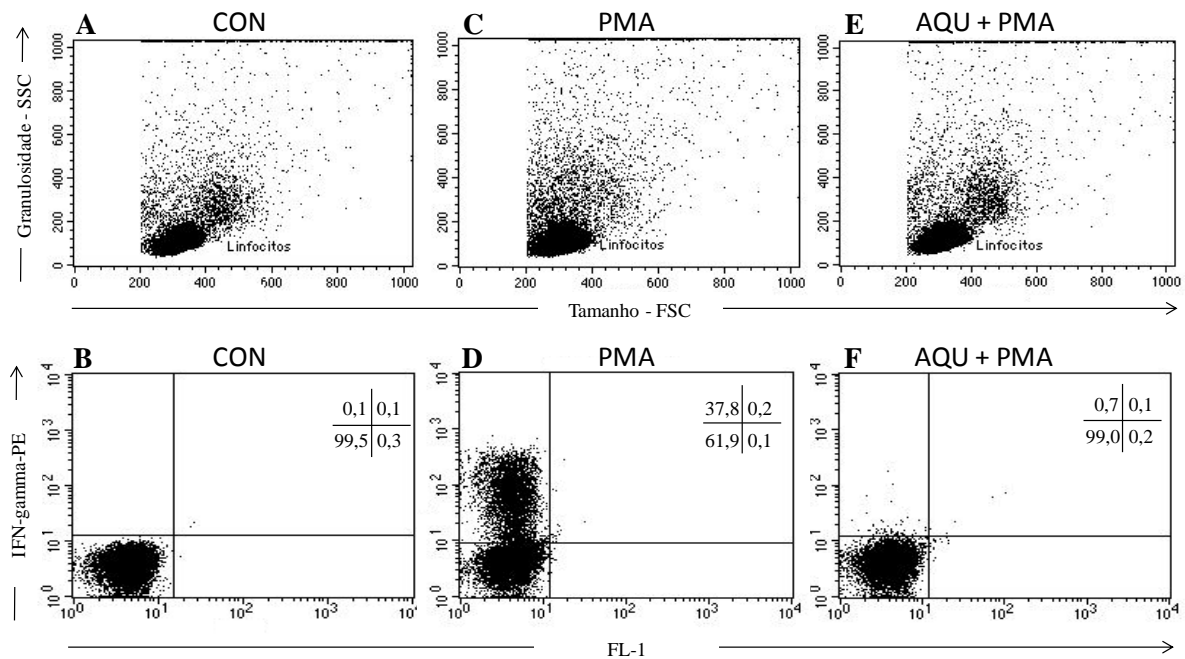
**FIGURA 4** - Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células viáveis (Anexina<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>), necróticas (Anexina<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>) ou apoptóticas (Anexina<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>), por citometria de fluxo. A e C - gráficos de distribuição puntual FSC x SSC utilizados para a seleção da população linfocitária. B e D - Gráfico de distribuição puntual FL-1 x FL-3 utilizados para avaliar o percentual de células marcadas com Anexina-V e/ou Iodoto de Propídeo. A e B representam culturas CON, C e D representam culturas ACE.

Para avaliar o potencial do extrato AQU em induzir a produção de citocinas anti ou pró-inflamatórias, 50  $\mu$ l suspensão celular (cerca de  $5 \times 10^5$  PBMC) foram incubadas em meio de cultura RPMI-1640 na ausência (CON) ou presença de 50  $\mu$ l do extrato AQU nas concentrações finais de 0,025 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL. Para os ensaios de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, as culturas celulares (cerca de  $5 \times 10^5$  PBMC) foram estimuladas com 25  $\mu$ L de Miristato Acetato de Forbol – PMA (Sigma, St. Louis, MO, USA) (25ng/ml), uma substância capaz de induzir a produção de citocinas do tipo 1 em leucócitos humanos, e 1  $\mu$ L de Ionomicina (Sigma, St. Louis, MO, USA) (1ng/mL), um ionóforo de cálcio que potencializa a ativação celular, e mantidas ou não sob efeito do extrato

AQU nas concentrações supracitadas. Todas as culturas tiveram o volume final ajustado para 1000  $\mu$ L com RPMI.

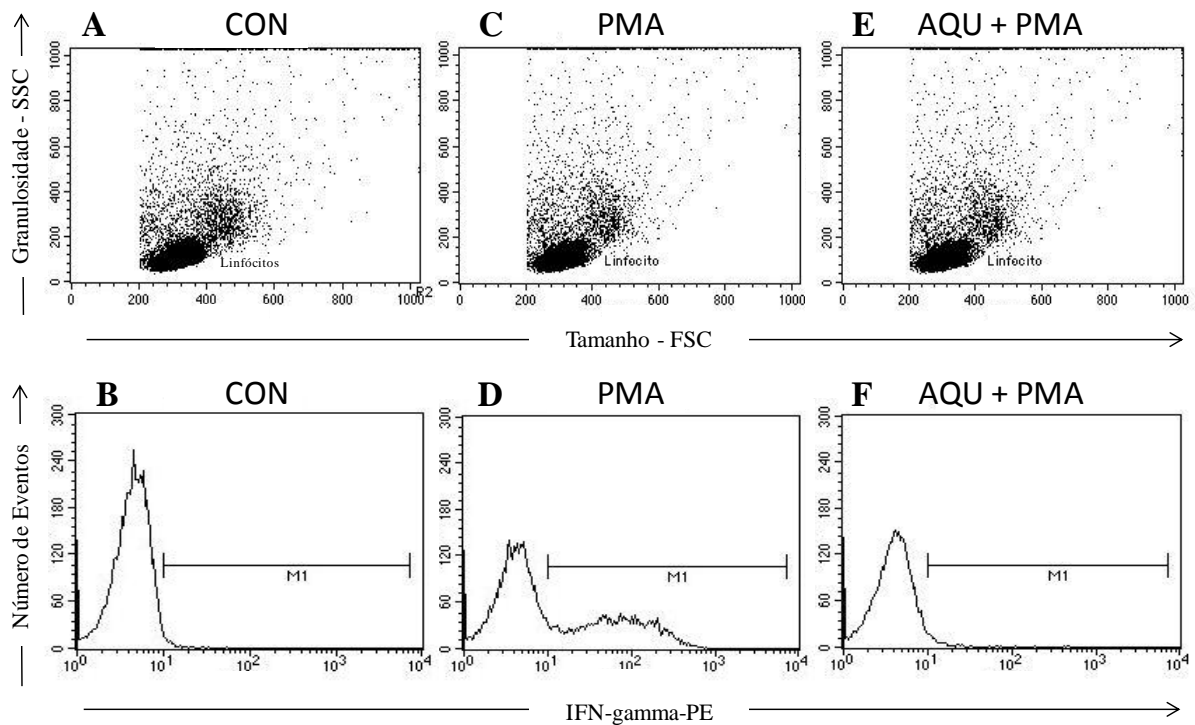
As culturas foram realizadas em placas de 24 poços, e permaneceram por 4 h (n = 8) ou 16 h (n = 6) em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Nas quatro últimas horas adicionou-se 12,5  $\mu$ L de Brefeldina A (Sigma, St. Louis, MO, USA) (1mg/mL) a todas as culturas para interromper o processo de transporte de proteínas, mantendo-as no citosol celular. Na sequência, as células foram fixadas com paraformaldeído 2 %, permeabilizadas e incubadas com anticorpos anti-citocinas conjugados com fluorocromos, conforme descrito em Brito-Melo *et al.*, 2006. Foram utilizados anticorpos marcados com ficoeritrina (PE), específicos para citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 (TAB. 1). As suspensões celulares foram avaliadas quanto à produção de citocinas, utilizando-se um citômetro de fluxo FACScan® (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), procedendo-se a aquisição de pelo menos 30.000 eventos dentro das células PBMC.

Para análise dos dados, utilizou-se o programa Cell-Quest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). As populações leucocitárias de interesse foram selecionadas mediante a análise de gráficos de distribuição pontual em função do tamanho e granulosidade (FSC x SSC), conforme as FIG. 5A e 5C. Em seguida, foi realizada a análise das citocinas intracitoplasmáticas em gráficos de distribuição pontual de fluorescência 2 (FL-2) versus fluorescência 1 (FL-1), em todas as culturas celulares avaliadas. Os dados primários, obtidos em cada quadrante dos gráficos de dispersão FL-2 x FL-1, corresponderam aos valores percentuais de células fluorescentes para determinado parâmetro, tendo como referência a população selecionada nos gráficos de dispersão SSC x FSC (FIG. 5B e 5C).



**FIGURA 5** - Estratégia de análise do percentual de células positivas para citocinas por citometria de fluxo. Gráfico de distribuição pontual FSC x SSC foram utilizados para a seleção das populações desejadas nas culturas CON (A) PMA (C) e AQU + PMA (E). Em seguida, foram utilizados gráficos de distribuição pontual FL-2 x FL-1 para avaliar o percentual de linfócitos citocinas<sup>+</sup> das culturas CON (B) PMA (D) e AQU + PMA (F).

A análise do perfil de citocinas por meio da intensidade média de fluorescência (IMF), permite correlacionar a intensidade média do sinal fluorescente emitido pelos anticorpos monoclonais fluorescentes específicos e direcionados para a citocina de interesse, bem como a quantidade dessa citocina produzida e armazenada no interior das células em análise, após a submissão das células à condição experimental estabelecida. Para a análise da IMF (FIG. 6), após selecionar a população de interesse, através dos parâmetros FSC x SSC (FIG. 6A, 6C e 6E), foram construídos histogramas de FL2 (PE) em função do número de eventos (FIG. 6B, 6D e 6F). A posição do marcador M1 foi determinada nas culturas não estimuladas (FIG. 6B), que serviu de referência para avaliar a intensidade de fluorescência das células marcadas com PE para as demais condições experimentais (FIG. 6D e 6F).



**FIGURA 6** - Sequência de procedimentos utilizados para as análises da intensidade média de fluorescência por citometria de fluxo. Gráfico de distribuição pontual FSC x SSC foram utilizados para a seleção das populações desejadas nas culturas CON (A) PMA (C) e AQU+ PMA (E). Em seguida, foram utilizados histogramas de FL-2 x número de eventos para avaliar a expressão de citocinas em linfócitos nas culturas CON (B) PMA (D) e AQU+ PMA (F).

### 5.9 Análise do efeito do extrato aquoso de *P. brasiliensis* sobre a proliferação de linfócitos humanos

Como análise complementar, avaliou-se a resposta proliferativa de linfócitos na presença do extrato AQU, uma vez que a proliferação de linfócitos é um evento inicial que reflete o grau de ativação das populações linfocitárias, sendo um importante evento junto à complexa rede de estímulos inflamatórios imune-mediados (BOYMAN *et al.*, 2007).

Para essa análise, foi utilizada a técnica de incorporação e decaimento da fluorescência de CFSE (5-[and-6]-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester), conforme descrito por Lyons *et al.* (2000). Para isso,  $5 \times 10^6$  células ressuspensas em PBS/BSA 0,1 % foram incubadas a 37°C por 10 min em 1000  $\mu$ L de CFSE (Sigma, St. Louis, MO, USA) (10  $\mu$ M) diluído em PBS/BSA 0,1 %. A reação foi interrompida adicionando-se 10 mL de RPMI completo gelado, seguido de incubação em gelo por 5 min. Após duas lavagens com RPMI completo (200 g, 4° C, 10 min), as células foram ressuspensas em 500  $\mu$ L de RPMI-1640.

Culturas celulares tratadas e suplementadas com o extrato AQU, sem a adição de mitógenos, foram realizadas para verificar o efeito mitogênico do extrato. Já para a análise do efeito inibitório do extrato AQU sobre a resposta proliferativa de linfócitos, foram realizadas culturas estimuladas com o mitógeno Fitohemaglutinina (PHA), na presença do extrato AQU. Cerca de  $5 \times 10^5$  células incubadas em RPMI completo foram estimuladas ou não, com 10  $\mu$ L de PHA (Sigma, St. Louis, MO, USA) (1  $\mu$ g/mL), na ausência ou na presença do extrato AQU, nas concentrações finais de 0,025 mg/mL (AQU 0,025), 0,05 mg/mL (AQU 0,05) e 0,1 mg/mL (AQU 0,1). Todas as culturas tiveram o volume final ajustado para 2000  $\mu$ L com RPMI completo. As culturas foram realizadas em placas de 24 poços e permaneceram por 5 dias em estufa úmida, a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, as células foram lavadas por 2 vezes com PBS gelado (200  $\mu$ L, 4°C, 10 min).

Para identificação das subpopulações linfocitárias, 20  $\mu$ L de suspensão celular foram incubados em placas de 96 poços de fundo redondo, com 2  $\mu$ L de anticorpos anti-CD3-biotinilado, anti-CD4-PeCy5 e anti-CD8-PeCy5 (tabela 1), por 15 min, a 4° C e ao abrigo da luz. Após lavagem com PBS-W (PBS 0,015 M pH 7,4 contendo BSA 0,5% e azida sódica 0,1%), as suspensões foram incubadas com 20  $\mu$ L de Estreptavidina-PE (1:75 em PBS-W), por 15 min, a 4° C e ao abrigo da luz. As células foram lavadas com PBS (200  $\mu$ L, 4°C, 10 min) e a proliferação celular foi determinada pela medida do decaimento da fluorescência do CFSE, através da citometria de fluxo (FACScan® - Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Após aquisição de 50.000 eventos, dentro de uma região (*gate*) correspondente às células de interesse, foi feita a análise da proliferação celular utilizando o programa *CellQuest* (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A fluorescência do CFSE foi medida no canal FL1, CD3-estreptavidina- PE, no canal FL2 e CD4- PeCy5 ou CD8-PeCy5 no canal FL3 (FIG. 3). Em gráficos de distribuição pontual, através dos parâmetros FSC x SSC, a população de linfócitos foi definida pela região R1, para culturas não estimuladas (FIG. 3A) e estimuladas com PHA (FIG. 3B). Os eventos em R1 foram analisados para fluorescência em gráficos pontuais de FL3 x FL2 (CD3 x CD4 ou CD3 x CD8) (FIG. 3C), dos quais regiões R2 foram definidas que incluíam as células T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>. Em seguida, os eventos em R1 e R2 foram analisados para intensidade de fluorescência do CFSE, usando histogramas de FL1 em função do número de eventos (FIG. 3E e 3F). A região M1 foi definida como células marcadas com CFSE derivadas de culturas não estimuladas, que representa o pico de células quiescentes (FIG.3D). Os picos de M2 a M6 foram definidos de acordo com picos de diferentes intensidades de CFSE em culturas estimuladas com PHA (FIG. 3E e 3F).



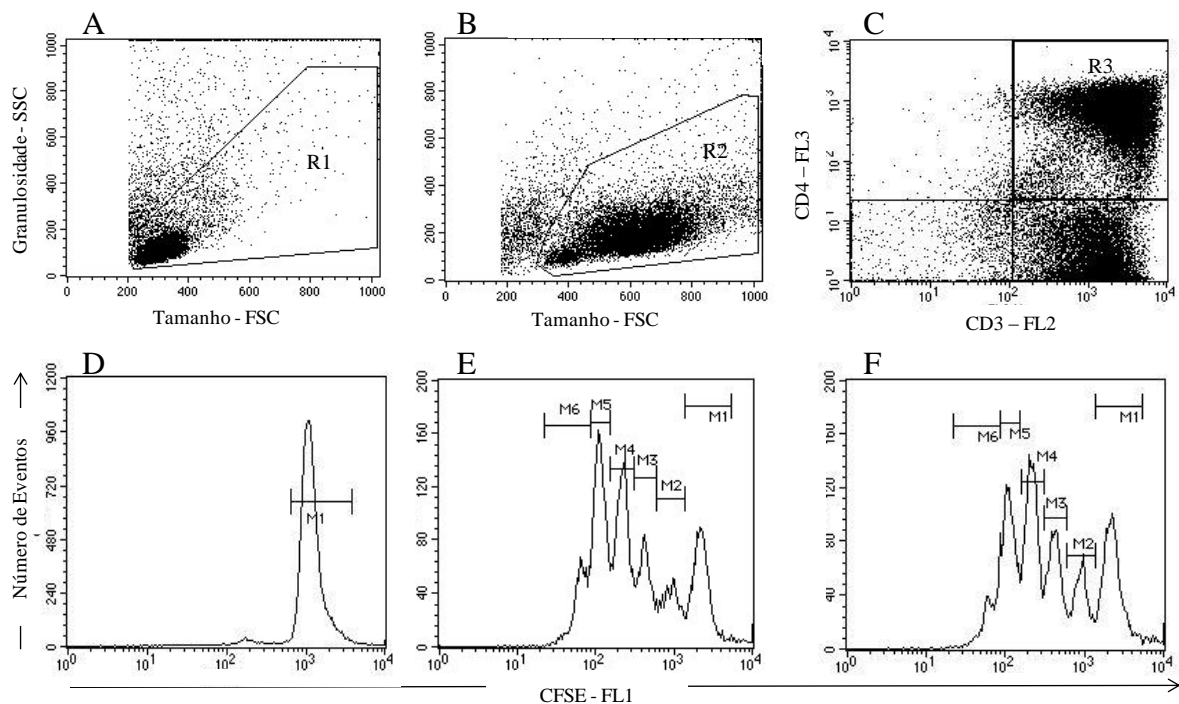
A proliferação foi determinada pelo índice de proliferação (IP), calculado como a seguir:

$$IP = \frac{100 - Y}{Y} \quad (1)$$

onde,

$$Y(\%) = \frac{X0}{2} + \frac{X1}{4} + \frac{X2}{8} + \frac{X3}{16} + \frac{X4}{32} + \frac{X5}{64} + \frac{X6}{64} \quad (2)$$

X0 representa a porcentagem de células que não se dividiram (localizadas em M1), e X1 a 6 representam os picos de divisão gradual (localizados de M2 a M7 (ÂNGULO e FULCHER, 1998)).



**FIGURA 7** - Sequência de procedimentos utilizados para as análises de proliferação celular pela diluição do CFSE. Gráfico de distribuição pontual FSC x SSC são utilizados para a seleção das populações desejadas nas culturas CON (A) e PHA (B). Em seguida, são utilizados gráficos de distribuição pontual FL-3 x FL-2 para selecionar a região R1 correspondente às subpopulações de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ou CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Histogramas de FL-1 x número de eventos, foram utilizados pra definir as regiões M1 a M6, com as quais foi obtido o índice de proliferação (IP) para a população de linfócitos (E), e para as subpopulações TCD4 e TCD8 (F).

## 6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi realizada uma análise descritiva dos dados. Após a análise da normalidade (Shapiro-Wilk), as diferenças entre os dados para as variáveis com distribuição simétrica foram testadas, utilizando ANOVA com *post hoc* de Tukey. Para as variáveis com distribuição assimétrica, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunns. Diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando  $P < 0,05$ . O *software* utilizado foi o GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Caracterização da amostra

A TAB. 3 contém a caracterização da amostra, incluindo o resultado dos parâmetros obtidos nos leucogramas realizados nos voluntários que participaram do presente estudo. De acordo com os dados obtidos, os voluntários apresentaram os parâmetros de leucogramas dentro dos limites da normalidade para indivíduos adultos.

**TABELA 3** - Caracterização da amostra

<b>Parâmetros (valores de referência*)</b>	<b>Média ± DP</b>
Número de voluntários	31
Homens	10
Mulheres	21
Idade	25 ± 5 anos
Leucócitos totais (3,5 - 11 x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	6,6 ± 1,7 x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
Neutrófilos (40-70%)	56 ± 8 %
Linfócitos (20- 50%)	37 ± 7 %
Monócitos (2-10%)	3 ± 1 %
Eosinófilos (0-8%)	2 ± 2 %
Basófilos (0-3%)	0 ± 0 %

\*Valores de referência de acordo com Xavier *et al.* (2010).

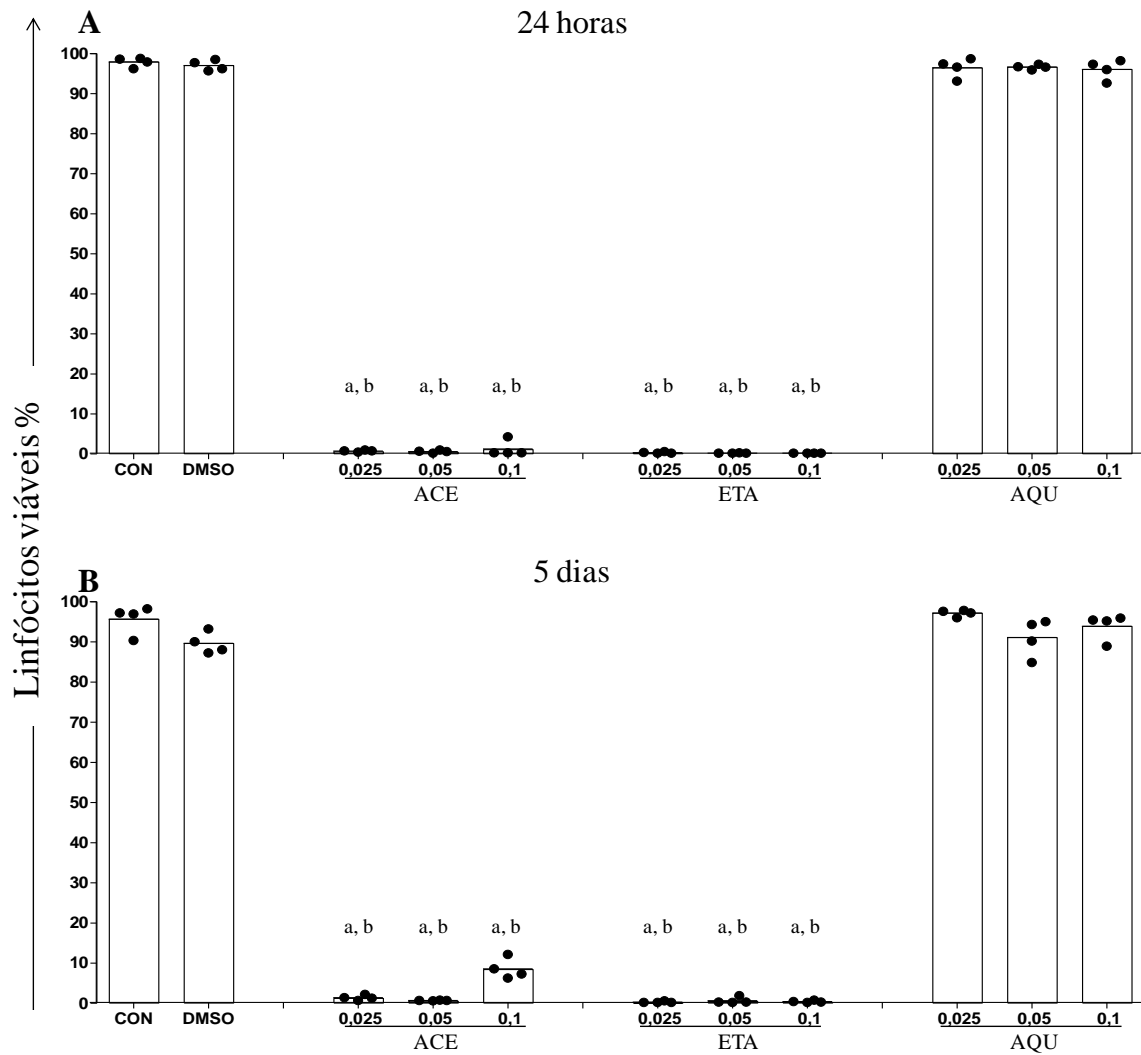
### 7.2 Efeito dos extratos de *P. brasiliensis* sobre a viabilidade de PBMC humanas, *in vitro*

Com o intuito de investigar uma possível ação citotóxica dos extratos de *P. brasiliensis*, que pudesse comprometer a realização de culturas celulares, realizou-se, inicialmente, uma triagem do efeito citotóxico dos extratos ACE, ETA e AQU sobre as PBMC. Para essa análise utilizou-se o método de exclusão com Azul de Tripán.

A FIG. 8 representa a análise percentual de PBMC viáveis, após incubação com os extratos citados anteriormente, nas concentrações finais de 0,025 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL, após 24 horas (FIG. 8A) e 5 dias de cultura (FIG. 8B). Os dados demonstram que o extrato AQU não reduziu a viabilidade celular, quando comparado às culturas CON, nas

diferentes concentrações avaliadas, tanto após 24 horas (CON:  $97,88 \pm 1,18$  %; AQU 0,025:  $96,45 \pm 2,39$  %; AQU 0,05:  $96,63 \pm 0,58$  %; AQU 0,1:  $96,03 \pm 2,45$  %), quanto após 5 dias de cultura (CON:  $95,65 \pm 3,61$  %; AQU 0,025:  $97,15 \pm 0,80$  %; AQU 0,05:  $91,08 \pm 4,69$  %; AQU 0,1:  $93,8 \pm 3,31$  %). Já os extratos ACE e ETA apresentaram uma significativa redução do percentual de células viáveis em relação às culturas CON, em todas as concentrações avaliadas, para os tempos de 24 horas (ACE 0,025:  $0,57 \pm 0,21$  %; ACE 0,05:  $0,42 \pm 0,33$  %; ACE 0,1:  $1,10 \pm 2,00$  %; ETA: 0,025:  $0,20 \pm 0,0$  %; ETA 0,05:  $0,0 \pm 0,0$  %; ETA 0,1:  $0,0 \pm 0,0$  %) e 5 dias de cultura (ACE 0,025:  $1,20 \pm 0,61$  %; ACE 0,05:  $0,50 \pm 0,08$  %; ACE 0,1:  $8,40 \pm 2,58$  %; ETA: 0,025:  $0,10 \pm 0,20$  %; ETA 0,05:  $0,47 \pm 0,82$  %; ETA 0,1:  $0,23 \pm 0,26$  %). Não houve diferença entre o percentual de células viáveis das culturas CON e controle do solvente (DMSO), nos diferentes tempos analisados (24 horas:  $97,02 \pm 1,30$  %; 5 dias:  $89,6 \pm 2,67$  %).

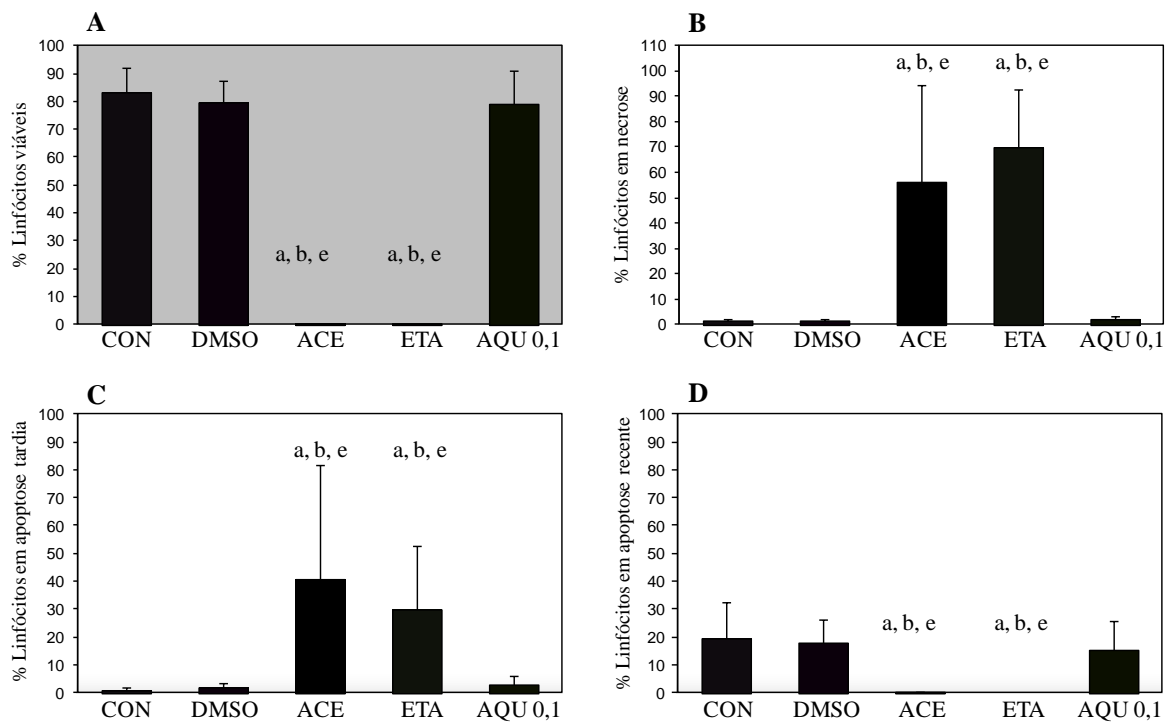
Para confirmar os resultados obtidos pela técnica de exclusão com Azul de Tripán e também, para detectar eventos precoces envolvidos no processo de morte celular, indetectáveis por essa técnica, investigou-se a ocorrência dos fenômenos de apoptose e necrose em células sob efeito dos extratos de *P. brasiliensis*, utilizando os marcadores Anexina V e Iodeto de Propídeo. A FIG. 9 representa os dados do ensaio de indução de morte celular. Não houve diferença significativa entre o percentual de células viáveis nas culturas tratadas com os extratos AQU ( $79,41 \pm 11,93$  %) e CON ( $82,22 \pm 9,03$  %) (FIG. 9A). Por outro lado, as culturas tratadas com os extratos ACE e ETA apresentaram um reduzido percentual de células viáveis (ACE:  $0,24 \pm 0,23$  %, ETA:  $0,02 \pm 0,04$  %). Já o percentual de linfócitos necróticos (FIG. 9B) foi significativamente maior nas culturas tratadas com o extrato ACE ( $56,42 \pm 38,28$  %) e ETA ( $69,91 \pm 22,80$  %), quando comparados às culturas CON ( $1,37 \pm 0,64$  %), AQU ( $2,13 \pm 1,11$  %) e DMSO ( $1,48 \pm 0,85$  %). Vale ressaltar que não houve diferença entre o percentual de linfócitos necróticos nas culturas DMSO e CON, bem como entre as culturas AQU e CON.



**FIGURA 8** - Percentual de PBMC viáveis nas culturas CON, DMSO e nas culturas ACE, ETA e AQU nas concentrações de 0,025, 0,05 e 0,1 mg/mL, nos tempos de 24 horas (A) e 5 dias (B). Os resultados foram expressos como o valor médio da viabilidade nos diferentes grupos. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA com *post hoc* de Tukey) são identificadas pelas letras “a” e “b”, para as comparações em relação às culturas CON e DMSO, respectivamente.

O percentual de células em apoptose tardia (FIG. 9C), induzida pelos extratos ACE ( $43,30 \pm 38,15$  %) e ETA ( $30,12 \pm 22,76$  %), foi maior quando comparado às culturas tratadas com o extrato AQU ( $2,99 \pm 2,90$  %), CON ( $1,08 \pm 0,95$  %) e DMSO ( $1,98 \pm 1,31$  %).

Devido à citotoxicidade apresentada pelos extratos ACE e ETA, optou-se por utilizar apenas o extrato AQU nos ensaios posteriores.



**FIGURA 9** - Percentual de linfócitos viáveis (A), em necrose (B), em apoptose tardia (C) e em apoptose recente (D) das culturas CON, DMSO, ACE, ETA e AQU 0,1. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA com *post hoc* de Tukey) foram identificadas pelas letras “a”, “b” e “e” para as comparações em relação às culturas CON, DMSO e AQU 0,1, respectivamente.

### 7.3 Efeito do extrato aquoso de *P. brasiliensis* sobre a expressão de citocinas em PBMC, *in vitro*

Para avaliar o potencial anti-inflamatório do extrato AQU, analisou-se o perfil de citocinas em PBMC sob efeito desse extrato, *in vitro*. Nos ensaios de ativação, investigou-se a capacidade do extrato AQU em estimular a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e moduladora (IL-10) em PBMC. Nos ensaios de inibição, avaliou-se o efeito inibitório desse extrato sobre a expressão dessas mesmas citocinas em PBMC estimuladas com PMA e Ionomicina, conforme descrito anteriormente.

### 7.3.1 Avaliação do efeito indutor do extrato aquoso de *P. brasiliensis* sobre a expressão de citocinas em linfócitos do sangue periférico

O efeito indutor do extrato AQU sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e moduladora (IL-10) em linfócitos humanos, *in vitro*, após 4h e 16h de cultura, respectivamente, está demonstrado na TAB. 4. Os resultados estão expressos em percentual de linfócitos positivos para as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10. De acordo com os resultados, não se observou aumento no percentual de linfócitos positivos para as citocinas em estudo, em quaisquer dos grupos analisados, nos diferentes tempos.

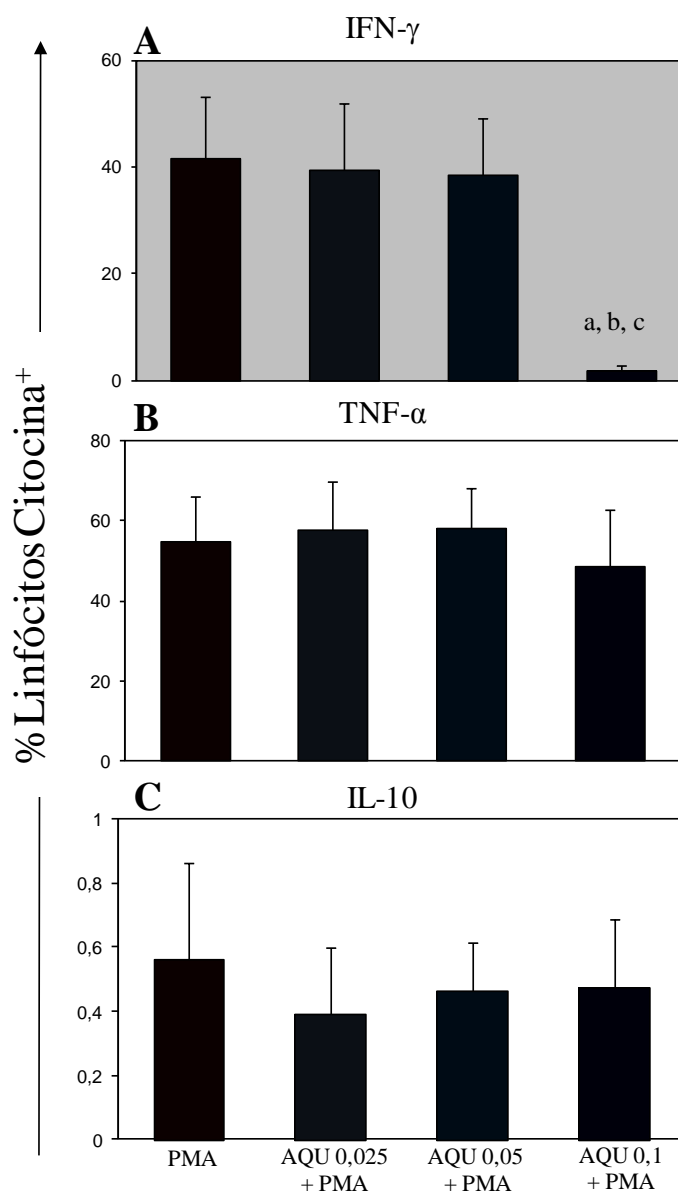
**TABELA 4** - Percentual de linfócitos positivos para as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10, após 4 e 16 horas de cultura.

Culturas	% de linfócitos citocinas <sup>+</sup>					
	4 horas			16 horas		
	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10
CON	0,11 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,21	0,16 $\pm$ 0,10	0,38 $\pm$ 0,22	0,58 $\pm$ 0,27	0,26 $\pm$ 0,20
AQU 0,025	0,07 $\pm$ 0,09	0,43 $\pm$ 0,13	0,17 $\pm$ 0,15	0,25 $\pm$ 0,17	0,53 $\pm$ 0,36	0,39 $\pm$ 0,27
AQU 0,05	0,06 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,24	0,12 $\pm$ 0,09	0,30 $\pm$ 0,31	0,48 $\pm$ 0,27	0,23 $\pm$ 0,19
AQU 0,1	0,13 $\pm$ 0,09	0,68 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,60	0,30 $\pm$ 0,12	0,57 $\pm$ 0,39	0,47 $\pm$ 0,15

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$  (ANOVA com *post hoc* de Tukey, para dados com distribuição simétrica; Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunns, para variáveis com distribuição assimétrica).

### 7.3.2 Efeito do extrato aquoso de *P.brasiliensis* sobre a expressão de citocinas em linfócitos estimulados com PMA.

A análise dos dados revelou que, nas culturas de células estimuladas com PMA e tratadas, simultaneamente, com o extrato AQU, durante 4 horas (FIG. 10), o percentual de linfócitos positivos para a citocina IFN- $\gamma$  (FIG. 10 A) foi 23 vezes menor nas culturas tratadas com o extrato AQU a 0,1 mg/mL ( $1,77 \pm 1,20$  %), quando comparado às culturas tratadas somente com PMA ( $41,72 \pm 11,50$  %). Não houve alteração no percentual de linfócitos positivos para as citocinas TNF- $\alpha$  (FIG. 10 B) e IL-10 (Fig 10 C) entre as diferentes culturas.

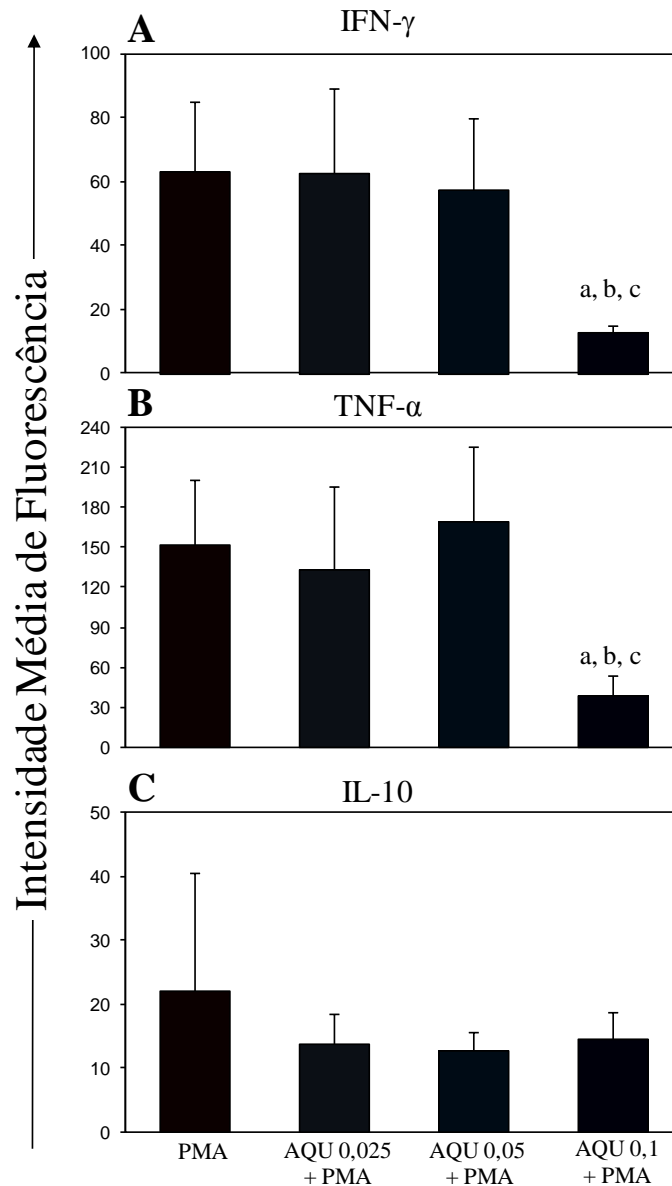


**FIGURA 10** - Análise do percentual de linfócitos-IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (A), linfócitos-TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (B) e linfócitos-IL-10<sup>+</sup> (C) das culturas PMA ■, AQU 0,025 + PMA ■, AQU 0,05 + PMA ■ e AQU 0,1 + PMA ■, após 4h. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA com *post hoc* de Tukey) foram identificadas pelas letras “a”, “b” e “c” para as comparações em relação às culturas PMA, AQU 0,025 + PMA e AQU 0,05 + PMA, respectivamente.

A análise por intensidade de fluorescência permite avaliar a densidade da proteína ou receptor de uma determinada molécula presente na superfície ou no interior de uma célula. Em nosso estudo de IMF para as citocinas analisadas, observou-se que a expressão de IFN- $\gamma$  (FIG. 11 A) foi 4,8 vezes menor nas culturas AQU 0,1 + PMA, quando comparado às culturas PMA (IFN- $\gamma$ : PMA  $63,43 \pm 21,48$ , AQU 0,025 + PMA  $62,90 \pm 26,20$ , AQU 0,05 + PMA  $57,59 \pm 22,08$  e AQU 0,1 + PMA  $13,07 \pm 1,73$ ). De forma semelhante, a expressão de TNF- $\alpha$



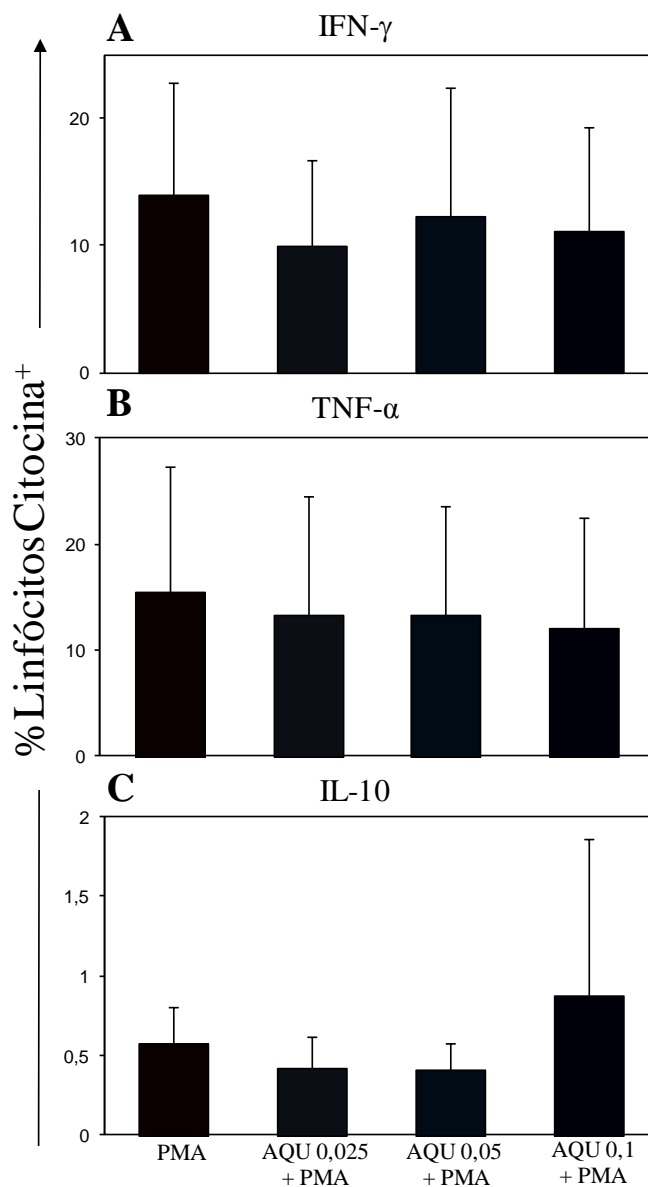
(FIG. 11 B) também foi inibida, uma vez que a IMF para essa citocina apresentou-se 3,8 vezes menor no grupo AQU 0,1, em relação ao grupo PMA (PMA  $152,34 \pm 49,04$ , AQU 0,025 + PMA  $133,42 \pm 62,27$ , AQU 0,05 + PMA  $169,15 \pm 56,77$  e AQU 0,1 + PMA  $39,18 \pm 14,77$ ). Não houve diferença na expressão de IL-10, medida pela IMF, entre as diferentes culturas.



**FIGURA 11** – Análise da intensidade média de fluorescência (IMF) de linfócitos-IFN- $\gamma^+$  (A), linfócitos-TNF- $\alpha^+$  (B) e linfócitos-IL-10 $^+$  (C) das culturas PMA ■, AQU 0,025 + PMA ■, AQU 0,05 + PMA ■ e AQU 0,1 + PMA ■, após 4h. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA com *post hoc* de Tukey) foram identificadas pelas letras “a”, “b” e “c” para as comparações em relação às culturas PMA, AQU 0,025 + PMA e AQU 0,05 + PMA, respectivamente.

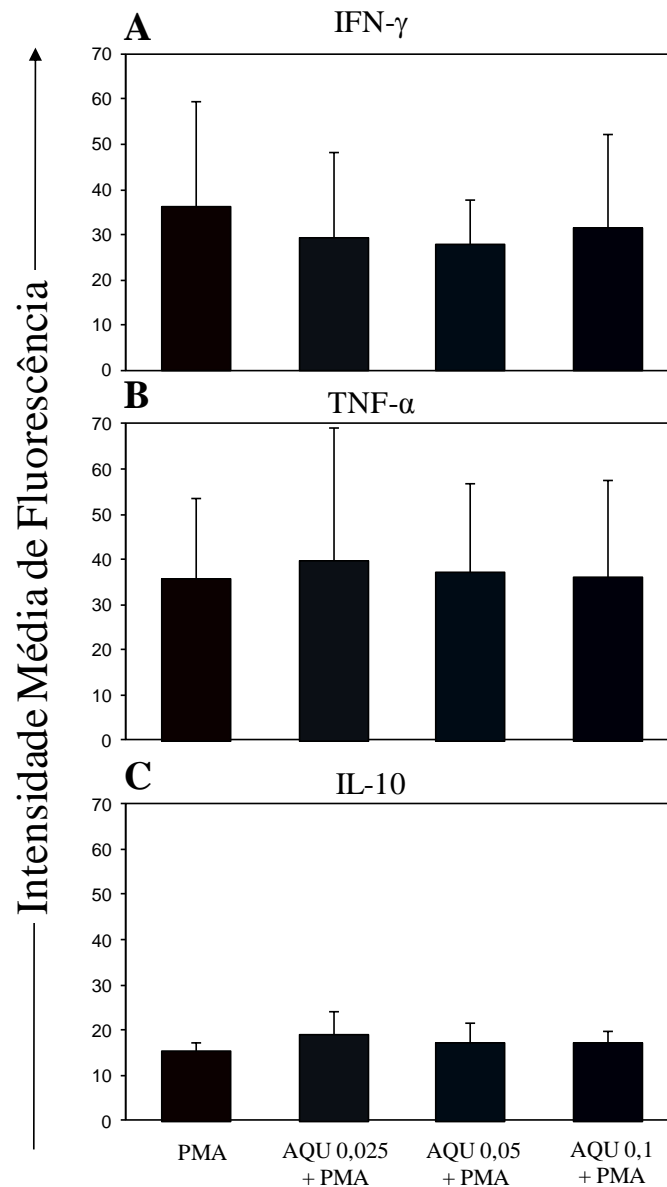
Na FIG. 12 está representada a análise do percentual de células positivas para IFN- $\gamma$  (FIG. 12A), TNF- $\alpha$  (FIG. 12B) e IL-10 (FIG. 12C) em linfócitos estimulados com

PMA, na presença de diferentes concentrações do extrato AQU, após 16 horas de cultura. A análise dos dados revela que não houve diferença estatisticamente significativa no percentual de linfócitos-IFN- $\gamma^+$ , linfócitos-TNF- $\alpha^+$  e linfócitos-IL-10 $^+$  entre as culturas avaliadas.



**FIGURA 12** - Análise do percentual de linfócitos-IFN- $\gamma^+$  (A), linfócitos-TNF- $\alpha^+$  (B) e linfócitos-IL-10 $^+$  (C) das culturas PMA ■, AQU 0,025 + PMA ■, AQU 0,05 + PMA ■ e AQU 0,1 + PMA ■, após 16h. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$  (Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunns).

Na FIG. 13, está representada a análise da IMF para as citocinas em estudo, em linfócitos estimulados com PMA, na presença de diferentes concentrações do extrato AQU, após 16h de cultura. Não houve diferença estatisticamente significativa na IMF em linfócitos para as citocinas IFN- $\gamma$  (FIG. 13A), TNF- $\alpha$  (FIG. 13B) e IL-10 (FIG. 13C), entre os grupos avaliados.



**FIGURA 13** – Análise da intensidade média de fluorescência (IMF) de linfócitos-IFN- $\gamma^+$  (A), linfócitos-TNF- $\alpha^+$  (B) e linfócitos-IL-10 $^+$  (C) das culturas PMA ■, AQU 0,025 + PMA ■, AQU 0,05 + PMA ■ e AQU 0,1 + PMA ■, após 16 h. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$  (Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunns).

### 7.3.3 Análise da indução de citocinas em monócitos do sangue periférico estimulados com extrato aquoso de *P.brasiliensis*

O efeito indutor do extrato AQU sobre a expressão das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 em monócitos, após 4 h e 16 h de cultura está apresentado na TAB. 5. Os resultados foram expressos como a média do percentual de células positivas para a citocina avaliada. Nenhuma

diferença foi observada para o percentual de monócitos positivos para as citocinas em estudo, nos diferentes grupos analisados.

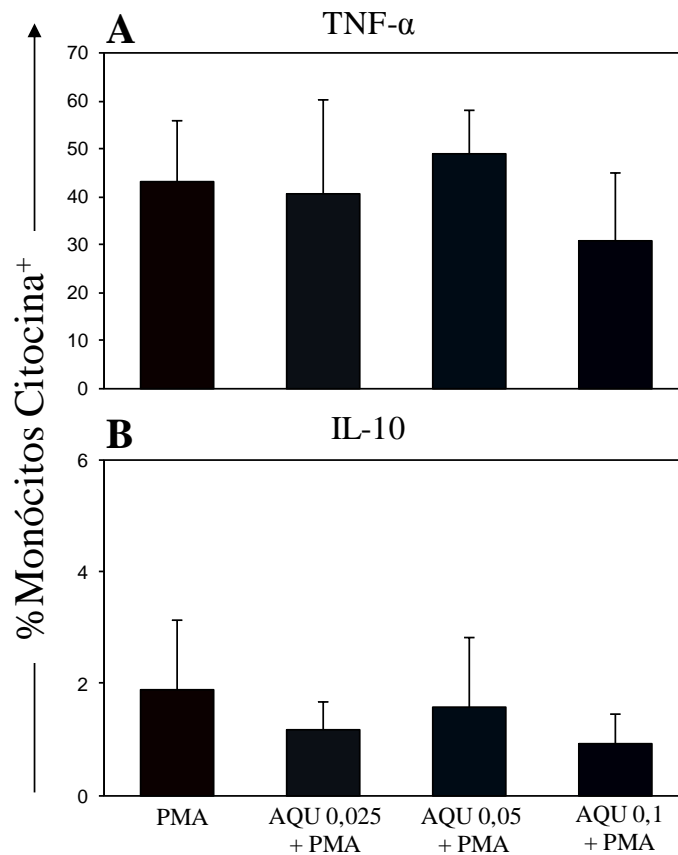
**TABELA 5** - Percentual de monócitos positivos para as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10, após 4 e 16 horas de cultura.

Culturas	Percentual de linfócitos citocinas <sup>†</sup>			
	4 horas		16 horas	
	TNF- $\alpha$	IL-10	TNF- $\alpha$	IL-10
CON	45,06 $\pm$ 14,19	2,50 $\pm$ 1,39	2,26 $\pm$ 2,11	2,00 $\pm$ 1,63
AQU 0,025	44,03 $\pm$ 13,65	1,21 $\pm$ 1,10	4,26 $\pm$ 2,57	3,80 $\pm$ 3,33
AQU 0,05	47,21 $\pm$ 19,64	1,36 $\pm$ 0,75	3,93 $\pm$ 2,25	4,12 $\pm$ 2,72
AQU 0,1	43,03 $\pm$ 13,52	1,65 $\pm$ 0,64	3,44 $\pm$ 2,12	1,84 $\pm$ 1,92

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$  (ANOVA com *post hoc* de Tukey, para dados com distribuição simétrica; Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunns, par variáveis com distribuição assimétrica).

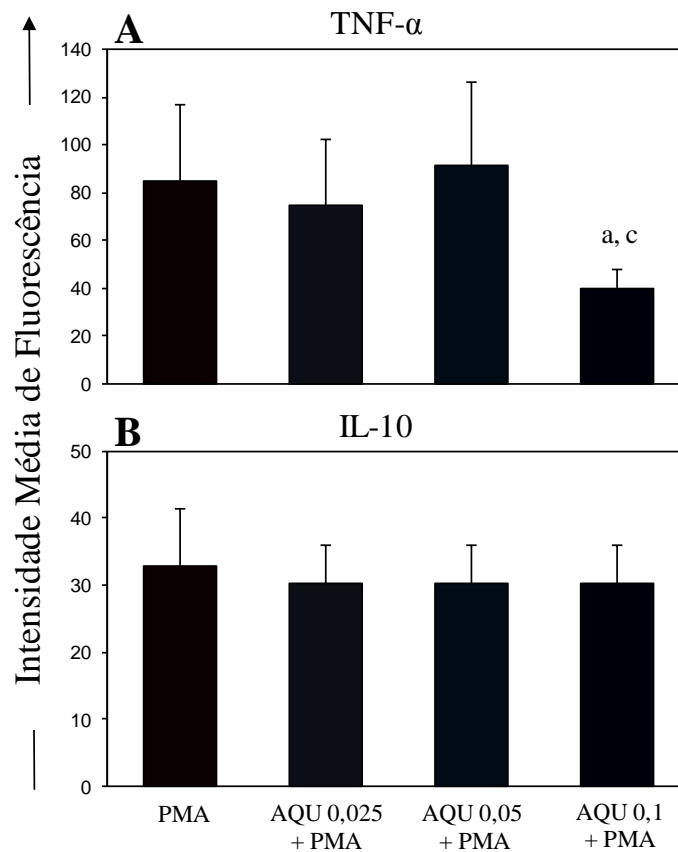
#### 7.3.4 Efeito do extrato aquoso de *P. brasiliensis* sobre a expressão de citocinas em monócitos estimulados com PMA

A análise do perfil de citocinas em monócitos após estimulação com PMA, na presença do extrato AQU, após 4 horas de cultura, está representada na FIG. 14. Os resultados revelam que não houve diferença na expressão de monócitos positivos para as citocinas TNF- $\alpha$  (FIG. 14A) e IL-10 (FIG. 14B), entre as diferentes culturas.



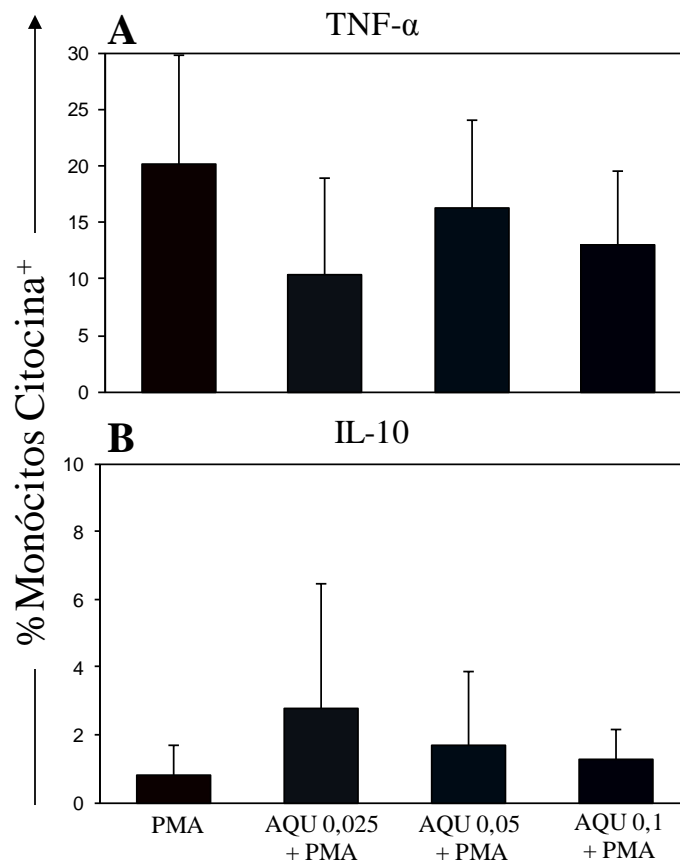
**FIGURA 14** - Análise do percentual de monócitos-TNF- $\alpha^+$  (A) e monócitos-IL-10<sup>+</sup> (B) das culturas PMA ■, AQU 0,025 + PMA ■, AQU 0,05 + PMA ■ e AQU 0,1 + PMA ■, após 4h. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$  (ANOVA com *post hoc* de Tukey).

A FIG. 15 representa a análise da IMF em monócitos estimulados, para as citocinas em estudo, após 4 h de cultura. De acordo com os resultados, a expressão de TNF- $\alpha$  (FIG. 15A) foi 2 vezes menor nas culturas AQU 0,1 + PMA ( $40,41 \pm 7,45$ ) quando comparado às culturas PMA ( $85,44 \pm 34,47$ ) e AQU 0,5 + PMA ( $91,67 \pm 35,19$ ). Nenhuma diferença foi observada na IMF para a citocina IL-10 (FIG. 15B), entre as diferentes culturas.



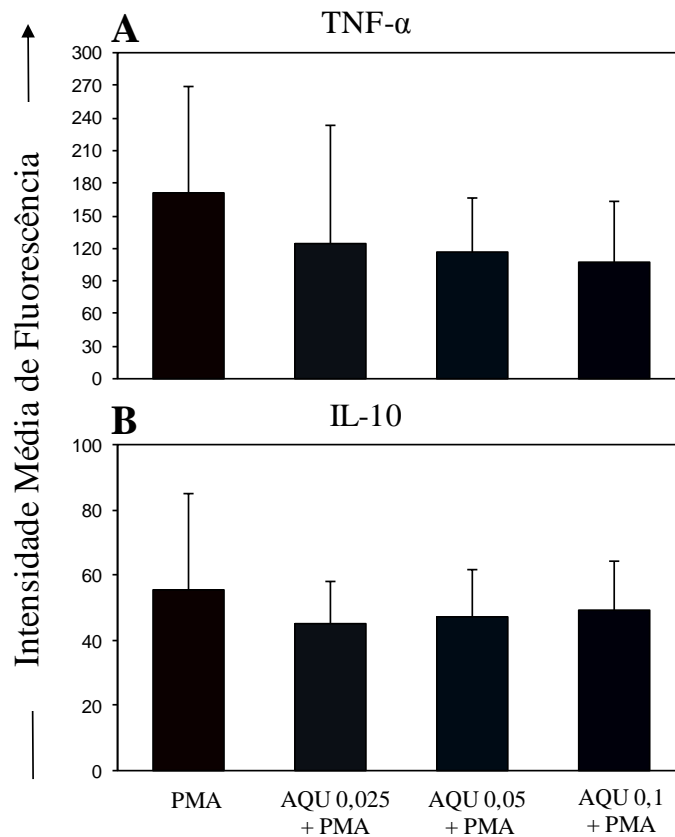
**FIGURA 15** – Análise da intensidade média de fluorescência (IMF) de monócitos-TNF- $\alpha^+$  (A) e monócitos-IL-10 $^+$  (B) das culturas PMA ■, AQU 0,025 + PMA ■, AQU 0,05 + PMA ■ e AQU 0,1 + PMA ■, após 4h. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA com *post hoc* de Tukey) foram identificadas pelas letras “a” e “c” para as comparações em relação às culturas PMA e AQU 0,05 + PMA, respectivamente.

Na FIG. 16 está ilustrada a análise do percentual de monócitos-TNF- $\alpha^+$  (FIG. 16A) e monócitos-IL-10 $^+$  (FIG. 16B), após 16 h de cultura. Não houve diferença no percentual de linfócitos positivos para as citocinas avaliadas nas diferentes culturas.



**FIGURA 16** - Análise do percentual de monócitos-TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (A) e monócitos-IL-10<sup>+</sup> (B) das culturas PMA ■, AQU 0,025 + PMA ■, AQU 0,05 + PMA ■ e AQU 0,1 + PMA ■, após 16h. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$  (Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunns).

A análise da IMF para as citocinas em estudo em monócitos estimulados, após 16 horas de cultura, está representada na FIG. 17. Nenhuma diferença foi observada para a expressão de TNF- $\alpha$  (FIG. 17A) e IL-10 (FIG.17B), entre as diferentes culturas.



**FIGURA 17** – Análise da intensidade média de fluorescência (IMF) monócitos-TNF- $\alpha^+$  (A) e monócitos-IL-10 $^+$  (B) das culturas PMA ■, AQU 0,025 + PMA ■, AQU 0,05 + PMA ■ e AQU 0,1 + PMA ■, após 16h. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$  (Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunns).

#### 7.4 Avaliação da proliferação celular em linfócitos e nas subpopulações linfocitárias TCD4 $^+$ e TCD8 $^+$ tratados com extrato aquoso de *P. brasiliensis*

Como análise complementar, e para fortalecer os dados observados nas análises de citocinas, avaliou-se a resposta proliferativa de linfócitos tratados com extrato AQU. Inicialmente, foi investigado se o extrato AQU nas concentrações de 0,025 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL apresentava atividade mitogênica. Em seguida, avaliou-se a atividade inibitória do extrato AQU sobre a proliferação de linfócitos e das subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8, estimulados com o mitógeno PHA.



#### 7.4.1 Efeito indutor do extrato aquoso de *P. brasiliensis* sobre a proliferação de linfócitos

O Índice de Proliferação (IP) dos linfócitos tratados com extrato AQU nas concentrações de 0,025 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL está apresentado na TAB.6. De acordo com os resultados, não houve indução da proliferação celular nas culturas tratadas com o extrato AQU nas diferentes concentrações, uma vez que o IP para essas culturas foi significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ), do que aquele da cultura PHA.

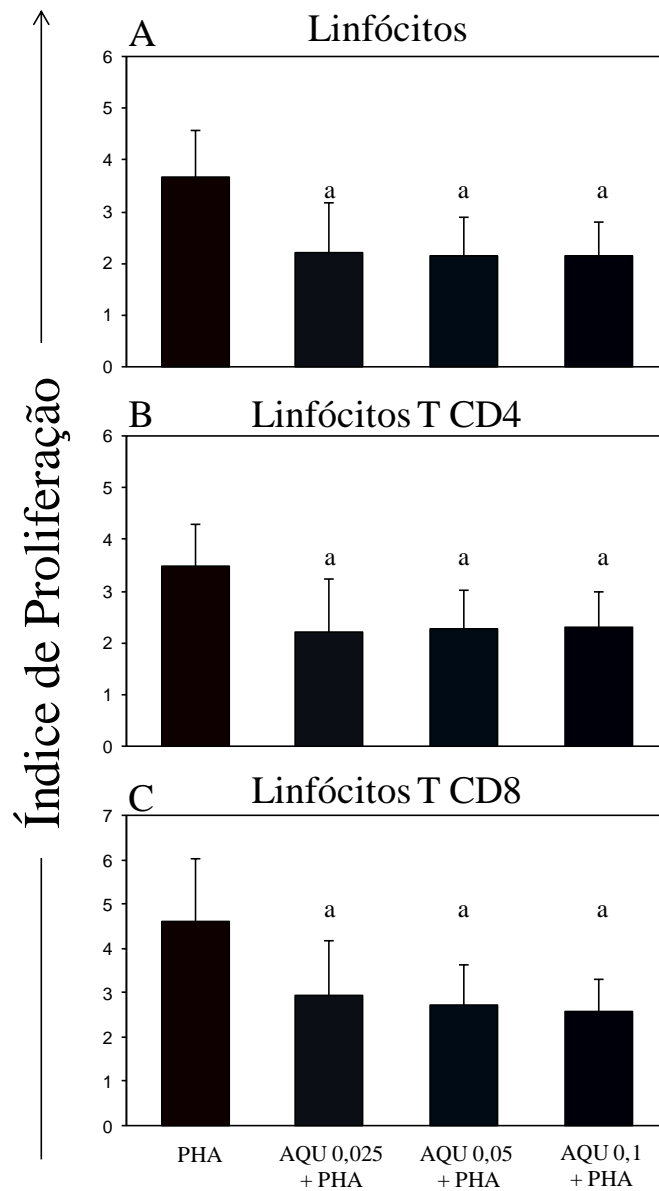
**TABELA 6** - Análise da atividade mitogênica do extrato aquoso de *P. brasiliensis* sobre linfócitos

Culturas	Índice de Proliferação
CON	$0,07 \pm 0,05^a$
PHA	$3,67 \pm 0,91$
AQU 0,025	$0,04 \pm 0,04^a$
AQU 0,05	$0,03 \pm 0,01^a$
AQU 0,1	$0,03 \pm 0,02^a$

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$  (ANOVA com *post hoc* de Tukey, para dados com distribuição simétrica; Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunns, para variáveis com distribuição assimétrica), em relação à cultura PHA foram identificadas pela letra “a”.

#### 7.4.2 Efeito do extrato aquoso de *P. brasiliensis* sobre a proliferação de linfócitos estimulados.

A FIG. 18 demonstra a análise da inibição da proliferação celular pelo extrato AQU sobre linfócitos do sangue periférico (FIG. 18A) e sobre as subpopulações de linfócitos T CD4 (FIG. 18B) e T CD8 (FIG. 18C). Os dados demonstram que o extrato AQU reduz a proliferação de linfócitos e das subpopulações de linfócitos TCD4 e T CD8 em todas as concentrações avaliadas (Linfócitos: PHA  $3,67 \pm 0,32$ , AQU 0,025  $2,22 \pm 0,34$ , AQU 0,05  $2,18 \pm 0,26$ , AQU 0,1  $2,16 \pm 0,23$ ; Linfócitos T CD4: PHA  $3,48 \pm 0,29$ , AQU 0,025  $2,22 \pm 0,37$ , AQU 0,05  $2,29 \pm 0,26$ , AQU 0,1  $2,33 \pm 0,24$ , e Linfócitos T CD8: PHA  $4,61 \pm 0,50$ , AQU 0,025  $2,94 \pm 0,44$ , AQU 0,05  $2,72 \pm 0,33$ , AQU 0,1  $2,61 \pm 0,25$ ).



**FIGURA 18** - Índice de proliferação celular de linfócitos (A) e das subpopulações linfocitárias CD4<sup>+</sup> (B) e CD8<sup>+</sup> (C), das culturas PHA ■, AQU 0,025 + PHA ■, AQU 0,05 + PHA ■ e AQU 0,1 + PHA ■. Dados expressos média ± desvio padrão. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA com *post hoc* de Tukey) foram identificadas pela letra “a” para as comparações em relação às culturas CON.

## 8 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Muitas plantas têm sido utilizadas na medicina popular, não só pela sua eficácia, mas também, devido ao fácil acesso e baixo custo (LÓPEZ, 2006). Apesar de utilizada como forma medicamentosa na medicina popular, as ações biológicas e a toxicidade da *P. brasiliensis* ainda não foram devidamente elucidadas. Diante disso, no presente estudo, investigou-se, inicialmente, a toxicidade de diferentes extratos da *P. brasiliensis* sobre PBMC humanas, pois a perda da viabilidade de células mantidas em contato com extratos vegetais poderia comprometer a análise dos parâmetros avaliados nos ensaios farmacológicos. Em seguida, investigou-se o potencial anti-inflamatório do extrato de *P. brasiliensis* sobre a produção de citocinas em linfócitos e monócitos humanos. Como análise complementar, investigou-se o efeito do extrato da planta sobre a proliferação de linfócitos estimulados pelo mitógeno fitohemaglutinina (PHA).

Extratos vegetais e solventes são considerados fatores externos que podem atuar diretamente na morte celular ou na ativação de mecanismos ligados à morte celular programada (GRIVICICH *et al*, 2007; PAROLIN; REASON, 2001). Diante disso, a primeira preocupação deste estudo foi avaliar a citotoxicidade dos extratos de *P. brasiliensis*. Por meio do teste de viabilidade celular por exclusão com o corante Azul de tripan, observou-se que o extrato AQU, nas concentrações finais de 0,025 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL, não demonstrou citotoxicidade às PBMC, mesmo após 5 dias de cultura (FIG. 8). Portanto, o extrato AQU, em todas as concentrações avaliadas, poderia ser utilizado nos ensaios para análise do perfil de citocinas e proliferação celular, pois o tempo de incubação das culturas celulares em tais protocolos são inferiores ou igual a 5 dias. Por outro lado, os extratos ACE e ETA, em todas as concentrações avaliadas, demonstraram expressiva citotoxicidade, a qual pode ser atribuída aos constituintes presentes nestes extratos e não ao solvente utilizado para a solubilização dos mesmos, uma vez que, o DMSO não afetou o percentual de células viáveis em relação às culturas CON.

O método de exclusão com Azul de tripan, que possibilita a contagem do número de células viáveis e não viáveis, em Câmara de Neubauer, por microscopia óptica, é a técnica mais comumente utilizada para avaliar a viabilidade celular. No entanto, limitações técnicas como morte celular causada por altas concentrações de Azul de Tripan, morte espontânea observada 5 minutos após o início da coloração, assim como a subjetividade da contagem das

células, ainda são pontos de constantes críticas a essa metodologia. Estudos prévios têm demonstrado que o corante de Azul de Tripán, quando complexado a proteínas, pode emitir fluorescência vermelha, passível de detecção pela citometria de fluxo (KUMAR *et al.*, 2008). Diante disso, foi padronizado no Laboratório de Imunologia/UFVJM, um ensaio de viabilidade celular, utilizando a coloração com Azul de Tripán, em uma concentração bem inferior àquela utilizada na análise por microscopia ótica, onde as células coradas são quantificadas por meio do percentual de células fluorescentes (FL-3+), pela citometria de fluxo. Além da análise quantitativa, o ensaio por citometria de fluxo permite acompanhar, qualitativamente, os parâmetros de tamanho e granulosidade das células, em gráficos de dispersão (FSC x SSC), no momento da aquisição de dados. O ensaio de viabilidade celular usando Azul de Tripán por citometria de fluxo está em vias de publicação pelo grupo de pesquisa envolvido no presente trabalho.

Todas as análises de viabilidade celular apresentadas no presente trabalho foram realizadas tanto pela citometria de fluxo, quanto pela microscopia ótica utilizando a Câmara de Neubauer. No entanto, a expressiva morte celular induzida pelos extratos ACE e ETA resultou em um reduzido número de PBMC disponível para contagem, por microscopia ótica. Em várias análises realizadas através da citometria de fluxo, as células mortas apresentaram uma grande perda do padrão morfológico celular, deslocando-se para uma região característica de debris celulares (ANEXO B), o que levou a um número bastante reduzido de células passíveis de serem identificadas pela microscopia ótica. Na citometria, isso pôde ser facilmente contornado utilizando-se um ajuste no *gate* (região selecionada para análise), em gráficos de tamanho *versus* granulosidade. Esse fator foi limitante para o uso da técnica convencional pelo Azul de Tripán, pois poderia levar a erros de interpretação, o que levou à opção por demonstrar apenas os dados obtidos pela citometria de fluxo.

A técnica de exclusão com Azul de tripan reflete a perda da integridade da membrana plasmática, mas não é capaz de diferenciar os fenômenos de apoptose e necrose (MASCOTTI *et al.*, 2000). Testes adicionais para confirmar a viabilidade de PBMC sob efeito dos extratos de *P. brasiliensis* foram realizados empregando os marcadores Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo (IP). Este é um método sensível que permite a detecção específica de células viáveis, apoptóticas ou necróticas (ENGELAND, 1998; VERMES *et al.*, 2000). A anexina V liga-se à fosfatidilserina que, normalmente, encontra-se localizada na porção interna da membrana plasmática e é externalizada durante a apoptose. Ao conjugar Anexina V ao Isotiocianato de fluoresceína (FITC) é possível identificar as células apoptóticas através da citometria de fluxo. O Iodeto de propídeo é um marcador nuclear fluorescente de alto peso

molecular capaz de penetrar apenas em células em processo de morte, que apresentam poros em sua membrana plasmática, seguido por incorporação ao DNA (BACSÓ *et al.*, 2000).

Através dos ensaios utilizando os marcadores Anexina V e PI, foi possível confirmar os resultados obtidos nos testes com Azul de tripan (FIG. 9). A viabilidade dos linfócitos não foi alterada pelo extrato AQU na concentração final de 0,05mg/mL, e esse extrato também, não foi capaz de induzir de forma significativa os fenômenos de apoptose e necrose nas PBMC, após 4 horas de cultura. A citotoxicidade dos extratos ACE e ETA foi confirmada através da redução significativa da viabilidade celular e indução de apoptose e necrose em um elevado percentual de linfócitos. Vale ressaltar que, a citotoxicidade demonstrada pelos extratos ACE e ETA não pode ser atribuída ao solvente DMSO, uma vez que os percentuais de linfócitos em necrose e em apoptose das culturas DMSO não foram diferentes da cultura CON. Devido à citotoxicidade apresentada pelos extratos ACE e ETA, nas doses testadas, optou-se por utilizar apenas o extrato AQU nos ensaios subsequentes.

A análise do perfil de citocinas em linfócitos e monócitos foi realizada por duas formas diferentes: através do percentual de células positivas para determinada citocina e por meio da Intensidade de fluorescência (IF), que é proporcional à intensidade de expressão da citocina pela célula.

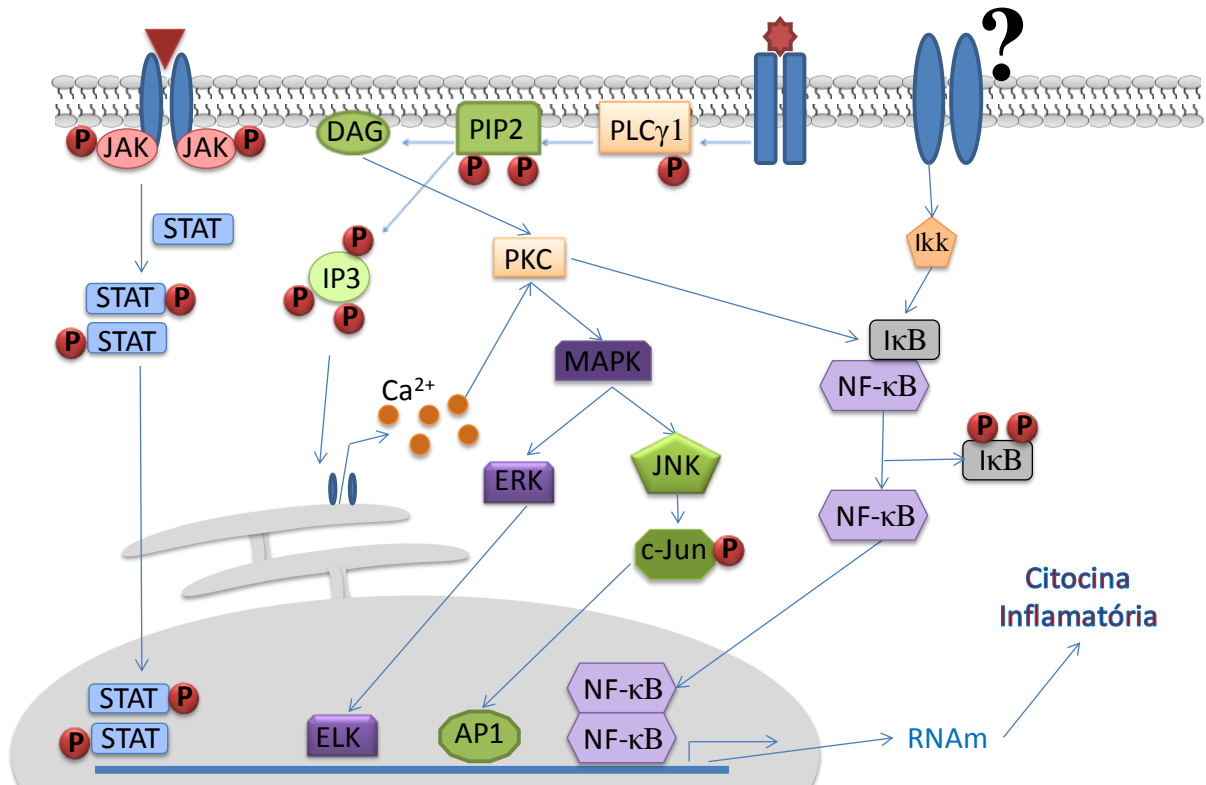
Nos ensaios de ativação, os dados demonstraram que o extrato AQU não foi capaz de induzir a expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 em PBMC, após 4 h ou 16 h de cultura, em todas as concentrações avaliadas.

Nos ensaios de inibição, utilizou-se nas culturas de PBMC, de maneira simultânea, o extrato de *P. brasiliensis* e uma substância química capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Nesse contexto, a substância escolhida para a produção de tais citocinas foi o Miristato Acetato de Forbol (PMA) em associação com a Ionomicina. O PMA é um éster de forbol que induz intensa síntese de citocinas pró-inflamatórias, através da ativação da via da PKC, uma quinase dependente de cálcio (RYVES *et al.*, 1991). A Ionomicina promove o aumento do influxo de cálcio, possibilitando a ativação da PKC pelo PMA (MORGAN; JACOB, 1994). Nas culturas estimuladas com PMA, após 4h de cultura, o extrato AQU, na concentração final de 0,1 mg/mL, reduziu 2 vezes a expressão da citocina TNF- $\alpha$ , determinada pelo valor de IMF, na população de monócitos. Em linfócitos, o extrato AQU 0,1 mg/mL reduziu a IMF para as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  cerca de 4,8 e 3,8 vezes, respectivamente. Além disso, o extrato AQU 0,1mg/mL reduziu 23 vezes o percentual de linfócitos expressando a citocina IFN- $\gamma$ . Uma vez que o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  desempenham

importantes papéis no estabelecimento da inflamação, a redução da expressão dessas citocinas poderia sugerir um possível efeito anti-inflamatório a ser explorado. Os resultados do presente estudo revelaram que extrato aquoso de *P. brasiliensis* reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos e monócitos estimulados, *in vitro*, o que poderia justificar a atividade antiinflamatória atribuída a *P. brasiliensis* na medicina popular. A capacidade de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em PBMC, também tem sido demonstrada por outras espécies da família Asteraceae, como a arnica montana, cuja tintura demonstrou redução da produção de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1, em culturas de PBMC estimuladas por LPS (KLAAS *et al.*, 2002). De forma semelhante, extratos etanólico e acetato de etila de *Lychnophora passerina* (Asteraceae), conhecida como arnica, demonstraram redução da expressão de TNF- $\alpha$  e indução da produção de IL-10, em cultura de monócitos estimulados por LPS/IFN- $\gamma$  (CAPELARI-OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Após 16 h de cultura, não houve diferença na expressão de quaisquer das citocinas avaliadas entre as diferentes culturas, o que pode ter sido influenciado pela cinética de produção de citocinas por células sob estímulo de PMA / Ionomicina. Mascher *et al* (1999) demonstraram que em linfócitos T estimulados por PMA, o pico de produção da citocina TNF- $\alpha$  ocorre em torno de 2 horas e declina rapidamente, já para o IFN- $\gamma$  o pico de produção ocorre em torno de 8 horas. Portanto, o tempo de 16 horas, utilizado neste estudo, parece não ser o tempo adequado para a análise do efeito do extrato AQU, sobre o perfil das citocinas intracitoplasmáticas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 em culturas de PBMC estimuladas com PMA.

Uma perspectiva seria a análise das vias de sinalização e dos fatores de transcrição envolvidos na redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias pelo extrato AQU de *P. brasiliensis*. Entre as principais vias intracelulares envolvidas na síntese de citocinas pró-inflamatórias estão as vias JAK/STAT e MAP quinases, e vias envolvidas na ativação dos fatores de transcrição AP1 e NF- $\kappa$ B (DUMONT, 1998; ALBANESI *et al.*, 2010) (FIG. 19). No entanto, para a avaliação dos mecanismos intracelulares envolvidos na atividade biológica da *P. brasiliensis*, faz-se necessário a utilização de substâncias isoladas e identificadas, provenientes de frações com destacada atividade inibitória sobre a produção das citocinas pró-inflamatórias. Cabe ressaltar, que o uso de extratos brutos contendo uma diversidade de constituintes químicos, são de grande valor no difícil processo de triagem em bioprospecção e, portanto, devem ter seu mérito reconhecido. Tais ensaios são fundamentais para a decisão sobre a continuidade ou não das investigações.



**FIGURA 19** - Vias intracelulares envolvidas na síntese de citocinas pró-inflamatórias (adaptado de Jeffrey *et al.*, 2007; Häcker e Karin, 2006).

Tendo em vista que: i) a produção de citocinas é consequência do processo de ativação celular; ii) o perfil proliferativo de células, principalmente linfócitos, reflete o grau de ativação das células; e iii) a proliferação de linfócitos é um evento inicial importante aos estímulos inflamatórios imune-mediados (BOYMAN *et al.*, 2007), optou-se por realizar uma análise complementar, avaliando a resposta proliferativa das células tratadas com extrato AQU, juntamente com mitógenos inespecíficos. Dessa forma, investigar o efeito inibitório de *P. brasiliensis* sobre a proliferação de células estimuladas poderia fortalecer os dados observados na análise realizada para o perfil de inibição de citocinas pró-inflamatórias. Conforme a FIG. 18, o extrato AQU a 0,1mg/mL inibiu a resposta proliferativa de linfócitos e das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Os efeitos inibitórios observados sugerem que componentes do extrato AQU possam modular mecanismos de ativação celular, que têm como consequência direta a produção de citocinas e a capacidade de expansão de linfócitos.

## 9 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o extrato aquoso de *P. brasiliensis* não apresentou atividade citotóxica sobre PBMC humanas e foi capaz em inibir a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , bem como a proliferação de linfócitos, *in vitro*. Esses dados sugerem um possível potencial anti-inflamatório e imunossupressor desse extrato, o que poderia explicar, pelo menos em partes, os benefícios terapêuticos atribuídos a *P. brasiliensis* na medicina popular.

O potencial anti-inflamatório da *P. brasiliensis* aqui demonstrado instiga a realização de estudos complementares na busca por isolar e identificar as substâncias responsáveis por esta atividade. Trabalhos adicionais, utilizando preferencialmente substâncias isoladas, são necessários para compreender quais as vias intracelulares envolvidas na atividade biológica da *P. brasiliensis*. Após um melhor entendimento desses mecanismos, estudos utilizando modelos animais de inflamação, associados ao tratamento com a *P. brasiliensis*, poderão ainda, esclarecer se a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias no contexto *in vitro* poderia influenciar no desenvolvimento do processo inflamatório *in vivo*.



## REFERÊNCIAS

- AHN, K.S.; NOH, E.J.; ZHAO, H.L.; JUNG, S.H.; KANG, S.S.; KIM, Y.S. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by *Platycodon grandiflorum* saponins via suppression of nuclear factor- $\kappa$ B activation in RAW 264.7 cells. *Life Sci.*, v.76, p. 2315-2328, 2005.
- ALBANESI, C., FAIRCHILD H.R., MADONNA, S., SCARPONI, C., PITÀ, O., LEUNG, D.Y.M., HOWELL, M. D.IL-4 and IL-13 Negatively Regulate TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  Induced  $\beta$ -Defensin expression through STAT-6, Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J. Immunol.*, v.179, p. 984-992, 2007.
- ALMEIDA, A.M.; PRADO, P.I.; LEWINSOHN, T.M. Geographical distribution of Eupatorieae (Asteraceae) in South-eastern and South Brazilian mountain ranges. *Plant Ecology*, v.174, p.163-181, 2004.
- ÂNGULO, R.; FULCHER, D.A. Measurement of *Candida*-Specific Blastogenesis: Comparison of Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester Labelling of T Cells, Thymidine Incorporation, and CD69 Expression. *Cytometry*, v.34, p.143-151, 1998.
- APOSTOLAKI, M.; ARMAKA, M.; VICTORATOS, P.; KOLLIAS, G. Cellular Mechanisms of TNF Function in Models of Inflammation and Autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun*, v.11 p.1-26, Feb. 2010.
- AVELAR, B.A.; LÉLIS, F.J.N.; AVELAR R.S.; WEBER M.; SOUZA-FAGUNDES E.M.; LOPES M.T.P.; MARTINS-FILHO O.A.; BRITO-MELO G.E.A. The crude latex of *Euphorbia tirucalli* modulates the cytokine response of leukocytes, especially CD4<sup>+</sup>T lymphocytes. *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol.21, n.4, p. 662-667, June, 2011.
- BACSÓ, Z.; EVERSON, R.B.; ELIASON, J. F. The DNA of Annexin V-binding Apoptotic Cells Is Highly Fragmented. *Cancer Research*, v.60, p.4623-4628, Aug. 2000.
- BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.*, v.78, p.431, 2005.
- BICALHO, H.M.S.; GONTIJO, M.C.; NOGUEIRA-MACHADO J.A. A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. *J. Immunol. Meth.*, v. 40, n. 1, p.115-116. 1981.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R.M.; ROBINSON, H. A hydroxygermacrene and other constituents from *Pseudobrickellia brasiliensis*. *Phytochemistry*, v. 23, n.8, p 1798-1799, 1984.
- BORISH, L.C.; STEINKE, J.W. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 111, n. 2, p.460-475.
- BOYMAN, J.F.; PURTON, C.D.; SURH, J., SPRENT. Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr. Opin. Immunol.*, 19: 320-326, 2007.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portariafito.pdf> Brasília: Diário Oficial da União 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 886, de 20 de abril de 2006. **Farmácia Viva**. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt0886\\_20\\_04\\_2010.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt0886_20_04_2010.html) Brasília: Diário Oficial da União 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC)**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf> Brasília: Diário Oficial da União 2006.

BREMER, K. Asteraceae: Cladistics and classification. Portland: *Timber Press*, p.429, 1994.

BRITO-MELO, G.E.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; CATALAN-SOARES B., RIBAS J.G.; MARTINS-FILHO O.A. IL-10 produced by CD4+ and CD8+ T cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived TNF-alpha and guarantee asymptomatic clinical status during chronic HTLV-I infection. *Clin Exp Immunol.*, v. 147, n. 1, p. 35-44, 2006.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; KOSCIUW, I.; MORAIS, T.B.; FERRARI, L.P. Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (guaco), visando o controle de qualidade da matéria-prima. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.19, n.2b, 2009.

CANCELLI, R.R.; EVALDT, A.C.P.; BAUERMAN, S.G.B. Contribuição à morfologia polínica da família Asteraceae Martinov. No Rio Grande do Sul - parte I. *Pesquisas Botânicas*, n.58, p. 347-374, 2007.

CAPELARI-OLIVEIRA, P., PAULA, C.A., REZENDE, S.A., CAMPOS, F.T., GRABE-GUIMARÃES, A., LOMBARDI, J.A., SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian "Arnica"). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 135, n. 2, p. 393-39, 2011.

CARNEIRO, M.R.B. **A flora medicinal no centro oeste do Brasil: um estudo de caso com abordagem etnobotânica em Campo Limpo de Goiás**. 2009. 242f. (Mestrado em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente) - Centro Universitário de Anápolis. Anápolis. GO. 2009.

CHEN, Y.; YANG, P.; LI, F.; KIJLSTRA, A. The Effects of Th17 Cytokines on the Inflammatory Mediator Production and Barrier Function of ARPE-19 Cells. *Plos One*, v.6, n.3, Mar, 2011.

CORDEIRO C.H.G; CHUNG M.C; SACRAMENTO L.V.S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. *Rev Bras Farmacogn.*, v.15, p. 272-278, 2005.

COSTA, L.A. *et al.* Immunomodulatory potential observed in Jequitinhonha's valley plants on in vitro cytokine production of peripheral blood leucocytes. In: **Technology and Medical Sciences International, 2008, Diamantina**. Technology and Medical Sciences International, 2008.

- DEL-VECHIO-VIEIRA, G; SOUSA, O.V; MIRANDA, M.A.; SENNA-VALLE, L; KAPLAN, M.A.C. Analgesic and Anti-inflammatory Properties of essential Oil from *Ageratum fastigiatum*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.52, n.5, p.1115-1121, 2009.
- DUMONT, F.J.; STARUCH, M.J.; FISCHER, P.; da SILVA, C., CAMACHO, R. Inhibition of T cell activation by pharmacologic disruption of the MEK1/ERK MAP kinase or calcineurin signaling pathways results in differential modulation of cytokine production. *Journal of Immunology*, v.160, n. 6, p. 2579-2589, Mar. 1998.
- EMAMI S.A.; TAGHIZADEH RABE, S.Z.; IRANSHAHI M.; AHI A.; MAHMOUDI M. Sesquiterpene lactone fraction from *Artemisia khorassanica* inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression through the inactivation of NF- $\kappa$ B. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, v.32, n. 4, p. 688-95, 2010.
- ENGELAND, M.V.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry*, v.31, p.1-9, 1998.
- FIERRO, I.M.; SILVA, A.C.B.; LOPES, C.S.; MOURA, R.S.; BARJA-FIDALGO, C. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, p. 19-24, 1999.
- FILARETOVA, L.P.; BAGAEVA, T.R.; MOROZOVA, O.YU.; ZELENA, D. The healing of nsaid-induced gastric lesion may be followed by small intestinal and cardiovascular side effects. *Journal of physiology and pharmacology*, v.62, n.6, p.619-625, 2011.
- GRIVICICH I.; REGNER A.; ROCHA A.B. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.53, n.3, p. 335-343, 2007.
- HÄCKER, H.; KARIN, M. Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases. *Science STKE*, v.2006, n.357, p.13, 2006.
- HAMBURGER, M. *Isatis tinctoria* - From the rediscovery of an ancient medicinal plant towards a novel anti-inflammatory phytopharmaceutical. *Phytochem Rev.*, v. 1, p. 333-344, 2002.
- HATTORI, E.K.O.; NAKAJIMA J.N. A família Asteraceae na Estação De Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*, v.59, n. 4, p. 687-749, 2008.
- HIND, D. J. N.; BEENTJE, H. J., Compositae: Systematics. *Royal botanic Gardens*, v.1, p.621-626, 1996.
- JEFFREY, K.L.; CAMPS, M.; ROMMEL, C.; MACKAY C.R. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.6, p.91-403, 2007.
- KAMINSKA, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1754, n.1-2, p.253-62, 2005.
- KIM, P.K.; DEUTSCHMAN, C.S. Inflammatory responses and mediators. *Critical Care of the Trauma Patient*, v.80, n.3, 2000.

- KIM, G.A.; KIM, H.Y.; KIM, J.W.; LEE, G.; LEE, E.; AHN, J.Y.; PARK, J.H.; LIM, J.M. Effectiveness of slow freezing and vitrification for long-term preservation of mouse ovarian tissue. *Theriogenology*, v.75, p.1045-105, 2011.
- KUMAR T.; MAJUMDAR A.; DAS, P.; SARAFIS, V.; GHOSE, M. Trypan blue as a fluorochrome for confocal laserscanning microscopy of arbuscular mycorrhizae in three mangroves. *Biotechnic & Histochemistry*, v.83, n.3-4, p.153-159, 2008.
- KUSHNER, I. Semantics, Inflammation, Cytokines and Common Sense. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v.9, n.3/4, p. 191-196, 1998.
- LEUNG, C.Y.; LIU, L.; WONG, R. N.S.; ZENG, Y.Y.; LI, M.; ZHOU, H. Saikosaponin-d inhibits T cell activation through the modulation of PKC $\theta$ , JNK e NF- $\kappa$ B transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.338, p.1920-1927, 2005.
- LEVY, D. E., GARCIA-SASTRE, A. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v.12, n.2-3, p.143-156, Jun-Set. 2001.
- LI, M.O.; WAN, Y.Y.; SANJABI, S.; ROBERTSON, A.K.; FLAVELL, R.A. Transforming growth factor- $\beta$  regulation of immune responses *Annu. Rev. Immunol.*, v.24, p.99-146, 2006.
- LOMBARDINO, J.G.; LOWE, J.A. The role of the medicinal chemist in drug discovery – then and now. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v.3, n.10, p.853-62, 2004.
- LYONS, A.B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol. Meth.*, v.243, p.147-154, 2000.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR., V. F; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova*, v.25, p.429-438, 2002.
- MAEYER -GUINARD J. Interferon-gamma. *Curr Opin Immunol.*, v.4, p.321-326, 1992.
- MASCHER, B.; SCHLENKE, P.; SEYFARTH, M. Expression and kinetics of cytokines determined by intracellular staining using flow cytometry. *J Immunol Methods.*, v.223, n.1, p.115-21, Feb, 1999.
- MASCOTTI, K.; McCULLOUGH, J.; BURGER, S.R. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion*, v.40, p.693-696, 2000.
- MCCOY, M.E., FINKELMAN, F.D., STRAUS, D.B. Th2-Specific Immunity and Function of Peripheral T Cells Is Regulated by the p56Lck Src Homology 3 Domain. *J Immunol*, v. 185, n.6, p.3285-94, 2010.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, v.140, p.171-176, 2010.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v.454, p.428-435, 2008.
- MORGAN, A.J., JACOB, R. Ionomycin enhances Ca<sup>2+</sup> influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem. J.*, v.300, p.665–672, 1994.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, v.136, p.2348–23570, 1986.

MUNOZ-SUANO, A.; CHINCHILLA, D.; AGUILAR, S.; MOLINILLO, J.M.G.; MACIAS, F.A.; RODRÍGUEZ-IGLESIA, M.A.; GARCIA-COZAR, F. Sesquiterpenes as immunosuppressants. *Transplantation*, v.88 n.3, p.S24-30, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.*, v.70, p.461-477, 2007.

NOUR A.M., KHALID S.A., KAISER M., BRUN R., ABDALLA W.E., SCHMIDT T.J. The antiprotozoal activity of methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L. *J. Ethnopharmacol.*, v.129, n.1, p.127-130, 2010.

OKUNADE, A. L. *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Fiterapia*, v.73, p.1-16, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS **Bulletin of the World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines.** A worldwide review. Geneva, 43p., 1998.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - OMS. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional.** Genebra, 67p., 2002.

PAROLIN M.B.; REASON I.J.M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq Gastroenterol*, v.38, n.2, p.138-14, 2001.

PFEFFER, L.M. The Role of Nuclear Factor kB in the Interferon Response. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v.31, n.7, 2011.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry*, v.68, n.22-24, p.2960-2972, 2007.

PREETHI, K. C.; KUTTAN, G.; KUTTAN R. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Indian J Exp Biol.*, v.47, n.2, p.113-20, 2009.

REIS, S.L.A; BELLINI, L.M. **Conhecimento e uso da flora para fins medicinais em comunidades ribeirinhas dos rios Paraná, PR e Cuiabá, MT:** 2007. [http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/diaadia/diadia/arquivos/File/conteudo/artigos\\_teses/2010/Biologia/artigos/flora\\_ribeirinha.pdf](http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/diaadia/diadia/arquivos/File/conteudo/artigos_teses/2010/Biologia/artigos/flora_ribeirinha.pdf) Disponível para acesso em 02/05/2010.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J.A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids - New Mechanisms for Old Drugs. *The New England Journal of Medicine*, v.353, p.1711-23, 2005.

RIBEIRO, J.F.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; MENDONÇA, R.C.; FILGUEIRAS, T. S. Caracterização florística e potencial de uso das espécies vasculares ocorrentes nas fazendas Trijunção, BA. Documentos. *Embrapa Cerrados*, 46. ed., p.1-48, 2001.

RYVES, J.W.; EVANS, A.T.; OLIVER, PARKER, J.P.; EVANS, J.F. Activation of the PKC isotypes  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  by phorbol ester of different biological activities. *Fed. Eur. Biochem. Soc.*, Amsterdam, v.288, n.1-2, p.5-9, 1991.

SANTOS, L.M. **Uso Popular de Plantas Medicinais na Comunidade de Avoadeira (Voadeira), Barra do Garças, Vale do Araguaia – MT.** 2002. 78 fl. (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal de Mato Grosso. Cuiabá, 2002

SARTORI, L.R.; FERREIRA, M.S.; PERAZZO, F.F.; MANDALHO LIMA, L.; CARVALHO, J.C.T. Atividade antiinflamatória do granulado de *Calendula officinalis* L. e *Matricaria recutita* L. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.13, p.17-19, 2003.

SCHETTER, A.J.; HEEGAARD, N.H.H.; HARRIS, C.C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*, v.31, n.1, p.37-49, 2010.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D.M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W. T.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism Clinical and Experimental*, v.57 (Suppl 1) S3-S9, 2008.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, v.18, n.3, p.385-405, 2004.

SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E.P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC., Compositae. *J Ethnopharmacol.*, v.22, n.3, p.281-93, 1988.

SOUZA F.A.A. **A cultura tradicional do sertanejo e o seu deslocamento para a implantação do Parque Nacional Grande Sertão Veredas.** 2006. 97f. Mestrado em Ciência Florestal - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

SUYENAGA E.S.; RECHE E.; FARIAS F.M.; SCHAPOVAL E.E.; CHAVES C.G.; HENRIQUES A.T. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. *Phytother Res.*, v.16, p.519-523, 2002.

TACHJIAN, A.; VIQAR, M.; ARSHAD, J. Use of Herbal Products and Potential Interactions in Patients With Cardiovascular Diseases. *Journal of the American College of Cardiology. Herbal Products and Cardiovascular Diseases*, v.55, n.6, p.515. 2010.

TILLEY, S.L.; COFFMAN, T.M.; KOLLER, B.H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J. Clin. Invest.*, v.108, p.15-23, 2001.

VALLADA, E.P. **Manual de Técnicas Hematológicas.** São Paulo: Atheneu, 1999. 423p.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quím. Nova*, São Paulo, v.28, n.1, Feb. 2005.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death *J. Immunol. Meth.*, v.243, p.167-190, 2000.

VIANA, P.L.; LOMBARDI, J.A. Florística e caracterização dos campos rupestres sobre Canga na Serra da Calçada, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*, v.58, n.1, p.159-177, 2007.

VITALINI, S.; BERETTA, G.; IRITI, M.; ORSENIGO, S.; BASILICO, N.; DALL'ACQUA, S.; IORIZZI, M.; FICO, G. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. *Acta Biochim Pol.*, v.58, n.2, p.203-9, Apr, 2011.

WAGNER, E.F. Bone development and inflammatory disease is regulated by AP-1 (Fos/Jun). *Ann Rheum Dis.*, v.69 (Suppl I), p.i86–i88, 2010.

WAJANT, H. The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ.*, v.49, p.1-15, 2009.

WEAVER, C.T.; HARRINGTON, L.E.; MANGAN, P.R.; GAVRIELI, M.; MURPHY K.M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, v.24, p.677–688, 2006.

XAVIER, R.M. *et al.* **Laboratórios na prática clínica** – consulta rápida. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 928p.

YAMAUCHI, N., NIITSU, Y. [Tnf]. *Gan To Kagaku Ryoho*, v.24, n.11, p.1486-1494, 1997.

YILMAZ, M. B. D.; YONTAR, O.C.; TURGUT, O.O.; YILMAZ, A.; YALTA, K.; GUL, M.; TANDOGAN, I. Herbals in cardiovascular practice: Are physicians neglecting anything? *International Journal of Cardiology*, v.122, p.48–51, 2007.

ZENZ, R.; EFERL, R.; SCHEINECKER, C.; REDLICH, K.; SMOLEN, J.; SCHONTHALER, H.B.; KENNER L.; TSCHACHLER, E.; WAGNER, E.F. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Research & Therapy*, v.10, n.01, p.201, 2008.

## ANEXO A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Termo de esclarecimento

#### Projeto de pesquisa

Avaliação, *in vitro*, do potencial anti-inflamatório de extratos etanólico, aquoso e acetato de etila de *Pseudobrickellia brasiliensis* sobre leucócitos do sangue periférico.

O objetivo deste estudo é avaliar se a planta arnica-do-ampo tem efeito sobre o sangue. Você está sendo convidado a participar do estudo por ter entre 18 e 39 anos e por não usar remédios. Se você concordar em participar do estudo, vamos coletar mais 10mL (um tubo) do sangue. No laboratório vamos fazer testes com seu sangue usando a arnica-do-campo. Os riscos de sua participação incluem hematoma (roxo no local da coleta de sangue), dor, tontura, enjôo e de contaminação. A coleta será feita por pessoa treinada, utilizando material estéril e descartável. Ao doar seu sangue para este projeto você estará contribuindo para os conhecimentos sobre esta planta que é utilizada na medicina popular. Os seus dados serão mantidos em sigilo e sua identidade não será revelada. Só os pesquisadores envolvidos no projeto terão acesso aos dados, que serão utilizados apenas para fins de pesquisa e divulgação científica em congressos, livros e revistas. Não está prevista qualquer forma de remuneração pela sua participação no estudo e você não terá nenhuma despesa (portanto, não está previsto nenhuma forma de ressarcimento). Quaisquer dúvidas que possam surgir durante o andamento deste estudo por parte do voluntário poderão ser esclarecidas junto aos membros da equipe responsáveis pelo projeto, pessoalmente ou por telefone. Você poderá recusar e/ou deixar de participar deste estudo a qualquer momento, sem nenhum constrangimento ou prejuízo na sua relação com os pesquisadores e a UFVJM. Os pesquisadores responsáveis por este projeto podem decidir sobre a sua exclusão do estudo por razões científicas, a respeito das quais você deverá ser devidamente informado. Em caso de qualquer dúvida deverá e/ou poderá entrar em contato a qualquer hora com a pesquisadora responsável Profa. Etel Rocha Vieira pelo telefone 38 35317814 (etelvieira@terra.com.br). Você também poderá contactar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM ( 3532-1200 – Ramal 1366) para informações sobre a aprovação do projeto pelo comitê.



### Termo de livre consentimento pós-informado

Eu discuti os riscos e benefícios da minha participação no estudo intitulado “**Avaliação, *in vitro*, do potencial anti-inflamatório de extratos etanólico, aquoso e acetato de etila de *Pseudobrickellia brasiliensis* sobre leucócitos do sangue periférico**” com os pesquisadores envolvidos. Eu li e compreendi todos os procedimentos que envolvem esta pesquisa e tive tempo suficiente para considerar a minha participação no estudo. Eu perguntei e obtive as respostas para todas as minhas dúvidas. Eu sei que posso me recusar a participar deste estudo ou que posso abandoná-lo a qualquer momento sem qualquer constrangimento ou prejuízo. Eu também compreendo que os pesquisadores podem decidir a minha exclusão do estudo por razões científicas, sobre as quais eu serei devidamente informado. Não terei nenhuma remuneração e nenhum gasto por participar do projeto. Tenho uma cópia deste formulário, o qual foi assinado em duas vias idênticas e rubricadas.

Portanto, aqui forneço o meu consentimento para participar do estudo intitulado

Eu discuti os riscos e benefícios da minha participação no estudo intitulado “Avaliação, *in vitro*, do potencial anti-inflamatório de extratos etanólico, aquoso e acetato de etila de *Pseudobrickellia brasiliensis* sobre leucócitos do sangue periférico”, durante todos os testes realizados.

Diamantina, \_\_\_\_\_

Assinatura do voluntário: \_\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_

Declaro que expliquei todos os objetivos, benefícios e riscos deste estudo ao voluntário, dentro dos limites de meus conhecimentos científicos.

Pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

Etel Rocha Vieira

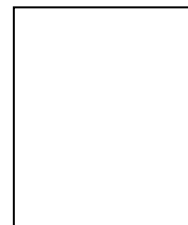
Comitê de Ética em Pesquisa - UFVJM

Campus JK- Rodovia MGT 367 – Km 583 – nº5000 – Alto da Jacuba

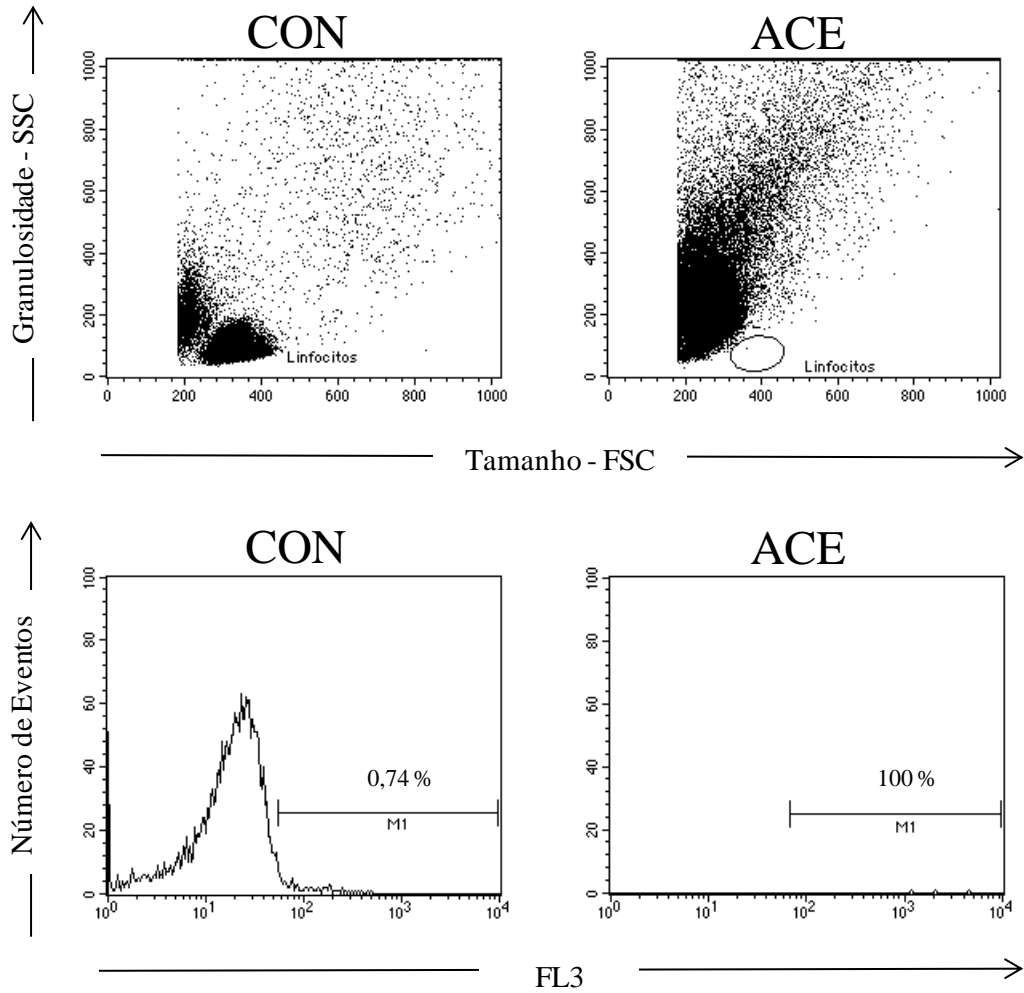
Coordenação: Prof.<sup>a</sup> Agnes Maria Gomes Murta

(38) 3532-1200

cep.secretaria@ufvjm.edu.br



## ANEXO B



**FIGURA 19** - Alteração do padrão morfológico celular de PBMC humanas sob efeito do extrato em Acetato de Etila de *P. brasiliensis* (ACE).