



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA METABÓLICA



**Extrato hidroalcoólico de *Baccharis trimera* (Carqueja)
regula a expressão de genes relacionados ao
metabolismo oxidativo em neutrófilos e fígado de ratos
intoxicados com paracetamol (APAP)**

Bruno da Cruz Pádua

**Ouro Preto
2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Extrato hidroalcoólico de *Baccharis trimera* (Carqueja) regula a expressão de genes relacionados ao metabolismo oxidativo em neutrófilos e fígado de ratos intoxicados com paracetamol (APAP)

Doutorando: Bruno da Cruz Pádua
Orientadora: Prof^a. Dra. Daniela Caldeira Costa
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maria Lúcia Pedrosa

*Tese apresentada ao Programa de Pós –
Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Ouro
Preto, como parte integrante dos requisitos para
a obtenção do título de Doutor, em Ciências
Biológicas, área de concentração: Bioquímica
Estrutural e Fisiológica.*

Ouro Preto

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Reitor

Prof.º Dr.º Marcone Jamilson Freitas Souza

Vice-Reitor

Prof.ª Dr.ª Célia Maria Fernandes Nunes

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof.º Dr.º Valdei Lopes de Araújo

NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Coordenador

Prof.º Dr.º Ieso de Miranda Castro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Coordenadora

Prof.ª Dr.ª Renata Nascimento de Freitas

P348e Pádua, Bruno da Cruz.

Extrato hidroalcoólico de *Baccharis trimera* (Carqueja) regula a expressão de genes relacionados ao metabolismo oxidativo em neutrófilos e fígado de ratos intoxicados com paracetamol (APAP) [manuscrito] / Bruno da Cruz Pádua. – 2014.

126f.: il. color.; grafs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa.

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

1. Enzimas - Teses. 2. Neutrófilos - Teses. 3. Stress (fisiologia) - Miocárdio - Contratilidade - Teses. I. Costa, Daniela Caldeira. II. Pedrosa, Maria Lúcia. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 612.35:616.36


Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

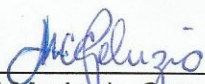
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:


“Extrato hidroalcoólico de *Baccharis trimera* (Carqueja) regula a expressão de genes relacionados ao metabolismo oxidativo em neutrófilos e fígado de ratos intoxicados com paracetamol (APAP)”


Aos vinte e cinco dias do mês de abril de 2014, às 8:30h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese de **Bruno da Cruz Pádua**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR..... o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

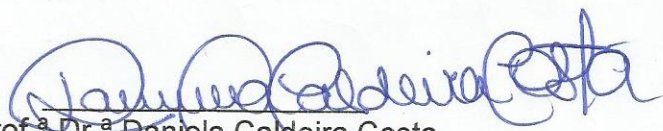
Membros da Comissão Examinadora:


Prof.^a Dr.^a Eliane Fialho de Oliveira
Examinadora (UFRJ)


Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo G Pelúzio
Examinadora (UCS)


Prof. Dr. Frank Silva Bezerra
Examinador (UFOP)

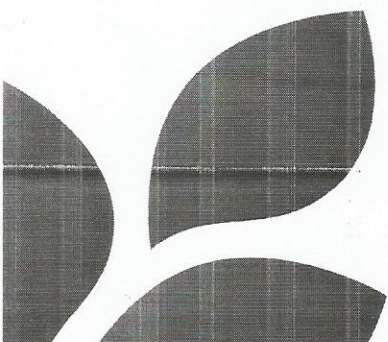

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Examinador (UFOP)


Prof.^a Dr.^a Daniela Caldeira Costa
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: **25/04/2014**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol



Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica** e no **Laboratório de Nutrição Experimental** do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio da *CAPES, FAPEMIG, CEFET E UFOP.*

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, Antônio de Pádua e Neuza Maria,
Por seus exemplos de vida e por tudo que eles representam.
E aos meus irmãos e sobrinhos,
Por alegrarem o meu viver a cada dia.
Obrigado por acreditarem tanto em mim e por entenderem as minhas ausências.
Amo vocês!

*“Nenhuma mente que se abre para uma nova
ideia voltará a ter o tamanho original”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Gostaria de agradecer a minha orientadora, **Professora Daniela Caldeira Costa**, pelo modo como me apoiou nesta investigação. Durante esses quatro anos de doutoramento alguns contratempos foram inevitáveis, de modo que muitos prazos e metas estabelecidos não puderam ser prontamente cumpridos. E foi em um desses contratempos que pude perceber e conhecer uma orientadora incrível, capaz de entender os problemas, dar conselhos e propor soluções, mesmo que estas extrapolassem os prazos e metas cautelosamente fixados. Concluo mais esta etapa na certeza de que sob sua orientação serei um profissional e, acima de tudo, um ser humano ainda melhor. Muito obrigado por toda atenção, disponibilidade, paciência, ensinamentos e determinação em sempre acreditar que tudo daria certo, independente dos momentos em que tudo parecia caminhar ao erro.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre ao meu lado e por me conceder a graça de chegar até aqui.

Aos meus professores e eternos orientadores **Maria Lúcia Pedrosa** e **Marcelo Eustáquio Silva**, por terem me aceitado no laboratório no ano de 2004 e por terem tido a paciente missão de ensinar a um jovem, recém-chegado à Universidade, os pilares básicos de como uma pesquisa deve ser feita. Agradeço, enormemente, pela oportunidade, orientação, compreensão, amizade, confiança e todos os ensinamentos transmitidos.

A professora **Cíntia Lopes de Brito Magalhães** que muito me ajudou com as qPCRs. Obrigado pela disponibilidade e por ser tão acessível sempre que precisei. Você foi de uma importância fundamental na realização de parte desse trabalho;

Ao aluno de pós-doutorado **Joamyr Victor Rossoni Júnior**, que além de grande amigo, me ajudou e aconselhou em todas as etapas deste trabalho. Obrigado por dividir comigo os seus conhecimentos, suas ideias e acima de tudo, sua amizade.

As pessoas incríveis que conheci em Ouro Preto e que se tornaram verdadeiros **Hermanos, Hermanas, Amores...** Obrigado pelos momentos felizes vividos na bancada do laboratório, nos corredores do NUPEB, nas confraternizações que já viraram evento fixo no calendário e nos outros inúmeros momentos que, se descritos, ficariam maiores do que a própria tese. Vou embora certo de que a amizade que nos une nos tornará sempre próximos e fraternos, independente da distância, que por ventura, insista em nos afastar.

Aos amigos de Belo Horizonte **Ana Carolina Craveiro, Ronaldo Figueiredo, Tomás Lopes** e **Victor Marcondes** que tornaram cada minuto em Belo Horizonte o suficiente para torná-la inesquecível.

Aos colegas de hoje e ontem que tive o prazer de conhecer no Laboratório de Bioquímica Metabólica e Nutrição Experimental, em especial a **Aline Mayrink de Miranda, Ana Carla Bandeira, Ana Flávia Santos Sampaio, Bianca Figueiredo, Carolina Araújo, Danielle de Lima Ávila, Fabiano Kenji Haraguchi, Glaucy Rodrigues de Araújo, Isabel Emerich, Joyce Ferreira Guerra, Keila Karine, Kely Raspante, Larissa Bonomo, Lorena Souza e Silva, Maísa Silva, Melina Oliveira, Nara Nunes, Natália Nascimento, Poliane Maciel, Pedro Amorim, Rogério Tadeu Ferreira, Sandra Camilo, Simone de Fátima Viana Cunha, Waleska Claudia Dorna Amaral**, a minha gratidão e a certeza de que, sem vocês, este trabalho não teria sido possível.

Aos técnicos do Laboratório de Nutrição Experimental e Bioquímica Metabólica, **Jair Pastor Mota, Clodoaldo** e **Renata Rebeca**, pela dedicação e disponibilidade que sempre me atenderam.

Aos Laboratórios pertencentes ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, em especial ao **Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Laboratório de Doença de Chagas, Laboratório de Microbiologia, Laboratório de Imunoparasitologia**, obrigado pelo suporte necessário a realização deste trabalho.

Aos amigos do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFETMG), em especial ao **Adriano Gonçalves, Maria Vitalina Borges, Patrícia Berhing e Renato Pereira**, obrigado pelo apoio, ajuda e compreensão.

RESUMO

O acetaminofeno (APAP) é um composto analgésico e antipirético que, quando administrado em doses elevadas, tem sido associado a significativa taxas de morbidade e mortalidade. Nos EUA e Europa, o APAP é um grande problema clínico, muitas vezes resultando em lesão hepática grave e insuficiência hepática aguda. Estudos recentes têm sugerido que os neutrófilos periféricos produzem espécies reativas durante a hepatotoxicidade induzida por APAP e plantas, tais como, *Baccharis trimera* tem compostos bioativos como flavonoides, relacionadas com a proteção do organismo contra os radicais livres. Portanto, o presente estudo tentou, após a caracterização química, ensaio de viabilidade e análise antioxidante, investigar o efeito protetor do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* na expressão de genes relacionados ao metabolismo oxidativo em neutrófilos e fígado de ratos intoxicados com paracetamol (APAP). Os resultados mostraram que o extrato de *B. trimera* exerceu propriedades antioxidantes por neutralizar as espécies reativas e diminuir a expressão de genes responsáveis pela produção dessas espécies em neutrófilos. Além disso, o pré-tratamento oral com *B. trimera* atenuou a atividade sérica de ALT e AST, diminuiu a atividade da enzima superóxido dismutase e aumentou a atividade de catalase e a concentração de glutatona total. A análise histopatológica confirmou a redução dos danos no fígado e das lesões causadas pelo APAP. O presente estudo sugere que a ação hepatoprotetora do extrato de *B. trimera* pode estar relacionada com o seu efeito na redução do estresse oxidativo causado pela hepatotoxicidade induzida pelo APAP.

Palavras-chaves: *Baccharis trimera*; acetaminofeno; enzimas antioxidantes; neutrófilos; NADPH oxidase; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Acetaminophen (APAP) is a common analgesic and antipyretic compound which, when administered in high doses, has been associated with significant morbidity and mortality. In the US and Europe, APAP is a major clinical problem, often resulting in severe liver injury and potentially acute liver failure. Recent studies have suggested that peripheral neutrophils produce reactive species during the hepatotoxicity induced by APAP and plants, such as, *Baccharis trimera* has bioactive compounds such as flavonoids, related to the organism's protection against free radicals. Therefore, this study attempted after the chemical characterization, viability assay and antioxidant analysis to investigate the protective effect of hydroalcoholic extract of *B. trimera* in the expression of genes related to oxidative metabolism in neutrophils and liver of rats intoxicated with acetaminophen (APAP). The results show that the *B. trimera* extracts exert antioxidant properties by scavenging ROS and decrease the expression of genes responsible by reactive species production in neutrophils. Moreover the oral pretreatment with *B. trimera* attenuated serum activities of ALT and AST that were enhanced by administration of APAP and decreases the activity of the enzyme superoxide dismutase and increases the activity of catalase and the concentration of total glutathione. Histopathological analysis confirmed the alleviation of liver damage and reduced lesions caused by APAP. The present study suggests that the hepatoprotective action of *B. trimera* extract may rely on its effect on reducing the oxidative stress caused by APAP-induced hepatic damage in a rat model.

Keywords: *Baccharis trimera*; acetaminophen; antioxidant enzymes; neutrophils; NADPH oxidase; oxidative stress

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	IX
<u>ABSTRACT</u>	X
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	XIV
<u>ABREVIATURAS</u>	XVI
<u>1 - INTRODUÇÃO</u>	1
<u>2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	4
<u>2.1. O FÍGADO</u>	5
<u>2.2. MODELO DE HEPATOTOXICIDADE INDUZIDO POR APAP</u>	7
<u>2.3. ESPÉCIES REATIVAS E ESTRESSE OXIDATIVO</u>	10
<u>2.4. DEFESAS ANTIOXIDANTES</u>	15
<u>2.5. BACCHARIS TRIMERA E SUA UTILIZAÇÃO COMO PLANTA MEDICINAL</u>	19
<u>2.6. FLAVONOÍDES</u>	23
<u>3 – OBJETIVOS</u>	26
<u>3.1 – OBJETIVO GERAL</u>	27
<u>3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	27
<u>3.2.1 - In vitro:</u>	27
<u>3.2.2 - In vivo:</u>	27
<u>4 – MATERIAL E MÉTODOS</u>	28
<u>4.1 - REAGENTES</u>	29
<u>4.2 - ANIMAIS</u>	29
<u>4.3 – COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO</u>	29
<u>4.4 – PREPARAÇÃO DO EXTRATO</u>	29
<u>4.5 – ENSAIO “IN VITRO”</u>	30
<u>4.5.1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO DETERMINADA POR HPLC</u>	30
<u>4.5.2 – TOXICIDADE EM CULTURA DE CÉLULAS HEPÁTICAS HEPG2</u>	30
<u>4.5.2.1 – CULTURA DE CÉLULAS</u>	30
<u>4.5.2.2 – ENSAIO DE TOXICIDADE COM MTT</u>	31
<u>4.5.3 – CAPACIDADE EM SEQUESTRAR O RADICAL DPPH•</u>	31
<u>4.6 – ENSAIO “IN VIVO”</u>	32
<u>4.6.1 – AVALIAÇÃO DA INJÚRIA HEPÁTICA INDUZIDA POR APAP</u>	32
<u>4.6.2 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</u>	32
<u>4.6.3 – ISOLAMENTO DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES</u>	33
<u>4.6.4 – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR</u>	34
<u>4.6.5 – DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO</u>	34
<u>4.6.6 – ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE</u>	34
<u>4.6.7 – ATIVIDADE DA CATALASE</u>	35

<u>4.6.8 – PREPARAÇÃO DO TECIDO HEPÁTICO</u>	35
<u>4.6.9 – ANÁLISE DOS MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM TECIDO HEPÁTICO</u>	36
<u>4.6.9.1 – PROTEÍNA CARBONILADA</u>	36
<u>4.6.9.2 – NÍVEIS DE TBARS</u>	37
<u>4.6.10 – ANÁLISE DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES EM TECIDO HEPÁTICO</u>	37
<u>4.6.10.1 – ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)</u>	37
<u>4.6.10.2 – ATIVIDADE DA CATALASE</u>	38
<u>4.6.10.3 – GLUTATIONA TOTAL, OXIDADA E REDUZIDA</u>	38
<u>4.6.10.4 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX)</u>	39
<u>4.6.10.5 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR)</u>	40
<u>4.6.11 – PROTEÍNAS TOTAIS</u>	41
<u>4.6.12 – ENSAIO DE RT-PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL</u>	42
<u>4.6.12.1 – EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE NEUTRÓFILOS</u>	42
<u>4.6.12.2 – EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE CÉLULAS HEPÁTICAS</u>	43
<u>4.6.12.3 – SÍNTESE DO CDNA</u>	43
<u>4.6.12.4 – DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES</u>	44
<u>4.6.12.5 – CURVA DE EFICIÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES</u>	44
<u>4.6.12.6 – RT-PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL</u>	44
<u>4.6.13 – AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA</u>	45
<u>4.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA</u>	46
<u>5 - RESULTADOS</u>	47
<u>6 - DISCUSSÃO</u>	62
<u>7 - CONCLUSÃO</u>	73
<u>8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	75
<u>9 - ANEXOS</u>	93
<u>ANEXO I – PROTOCOLOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS</u>	94
<u>I.1 - Alanina Aminotransferase</u>	94
<u>I.2 - Aspartato Aminotransferase</u>	95
<u>ANEXO II – TRABALHO PUBLICADO</u>	97
<u>ANEXO III – TRABALHO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO</u>	98
<u>ANEXO IV – RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS</u>	99

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Antioxidantes de baixo peso molecular e seus principais alvos.

Tabela II – Viabilidade e toxicidade do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre células hepáticas (HEP G2). Os dados estão expressos em porcentagem. A linhagem de células GEP G2 foi incubada na ausência de *B. trimera*, enquanto que a linhagem Hep G2+Bt corresponde a cultura de células incubadas com extrato de *B. trimera*.

Tabela III – Percentual de inibição do radical DPPH• por diferentes concentrações do extrato de *B. trimera* e do antioxidante de referência Trolox, em 30 e 60 minutos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de lóbulo hepático.

Figura 2 – Metabolização hepática do paracetamol.

Figura 3: Complexo NADPH oxidase.

Figura 4 - Formação do óxido nítrico a partir da L-arginina.

Figura 5 - Formação de espécies reativas e ação de enzimas antioxidantes.

Figura 6 – Foto da espécie de *Baccharis trimera*.

Figura 7: Estrutura geral dos flavonóides.

Figura 8 – Indução da transcrição gênica de enzimas antioxidantes por polifenóis, através da ativação do Elemento de Resposta Antioxidante (ARE) mediada fator de transcrição Nrf2.

Figura 9 – Delineamento experimental.

Figura 10 – (A) Cromatografia de amostras de *B. trimera* preparadas para administração em animais experimentais; (B) Espectro UV de picos eluídos em 3.13 minutos; (C) Espectro UV de picos eluídos em minutos 4.36; (D) Espectro UV de picos eluídos em 4.63 minutos (E) Espectro UV de picos eluídos em 11.84 minutos; (F) Espectro UV de picos eluídos em 22.60 minutos.

Figura 11 – (A e B) Cromatografia HPLC-DAD, monitorado em 254 nm e espectro de absorção de UV da quercetina; (C e D) Cromatografia HPLC-DAD, monitorado em 254 nm e espectro de absorção de UV da rutina.

Figura 12 – Hepatotoxicidade do APAP em ratos Fischer. A atividade sérica de ALT e AST foram medidas nos tempos indicados após uma dose única de APAP (835 mg/kg).

Figura 13 – Efeito do extrato de *B. trimera* sobre a expressão gênica das subunidades da NADPH oxidase em neutrófilos de ratos 24 h após a intoxicação com APAP.

Figura 14 – Efeito do extrato de *B. trimera* sobre a produção de NO (A) e sobre a expressão do gene da iNOS (B) em neutrófilos de ratos 24 h após a intoxicação com APAP.

Figura 15 – Efeito do extrato de *B. trimera* sobre a atividade e sobre a expressão das enzimas CAT e Zn-SOD em neutrófilos de ratos 24 h após a intoxicação com APAP.

Figura 16 – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a atividade das enzimas ALT e AST no soro de ratos 24h após a intoxicação com APAP.

Figura 17 – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre os níveis de proteínas carboniladas e TBAR no fígado de ratos 24h após a intoxicação com APAP.

Figura 18 – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a expressão de mRNA das enzimas ZN-SOD (A), Mn-SOD (B) e CAT (C) e sobre a atividade de SOD (D) e CAT (E) em fígado de ratos 24h após a intoxicação com APAP.

Figura 19 – - Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a expressão de mRNA de γ CGL (A) e sobre os níveis de glutaciona total em fígado de ratos 24h após a intoxicação com APAP.

Figura 20 – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a expressão de mRNA de GPx (A) e sobre a atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx) (B), e atividade da Glutaciona Redutase (C) em fígado de ratos 24h após a intoxicação com APAP.

Figura 21 – Secção de fígado de ratos após 24 horas de administração com PBS (A), extrato de *B. trimera* (B), APAP (C) e extrato de *B. trimera* e APAP (D).

Figure 22 – Mecanismo proposto para a modulação das espécies reativas pelo extrato de *B. trimera*. (1) Proteção indireta pela inibição de fontes capazes de gerar espécies reativas, tais como NADPH oxidase e iNOS. (2) Neutralização direta das espécies reativas.

Figura 23 - Diagrama esquemático que mostra o efeito protetor do extrato de *B. trimera* na toxicidade induzida por acetaminofeno.

ABREVIATURAS

APAP - Acetaminofeno/ Paracetamol
ARE – Elemento de Resposta Antioxidante
ATP - Adenosina trifosfato
ALT - Alanina aminotransferase
AST - Aspartato aminotransferase
 β 2M - β 2 microglobulina
BHT - Butil-hidroxi-tolueno
CAT - Catalase
CLAE-DAD - Cromatografia líquida de alta eficiência
DEPEC - Dietilpirocarbonato
DNA - Ácido desoxirribonucléico
DTNB - ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)
DNPH - 2,4 - Dinitrofenilhidrazina
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EDTA - Ácido atilenodiamino tetra-acético
EFS - Extração de fase sólida
EROs - Espécies reativas de oxigênio
ERNs - Espécies reativas de nitrogênio
FDA - Food Drug Administration
GPx - Glutaciona Peroxidase
GR - Glutaciona Redutase
GSH - Glutaciona reduzida
GSSG - Glutaciona oxidada
GST - Glutaciona transferase
 H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio
HSV-1 - Vírus da Herpes tipo I
IL-10 - Interleucina - 10
KEAP 1 - Kelch-like ECH associating protein 1
MeOH - Metanol
NADPH - Nicotidamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAPQUI - N-acetil-p-benzoquinona-imine

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

Nrf2 - Fator Nuclear derivado de eritróide 2

O₂⁻ - Radicial superóxido

OH - Radical hidroxila

ONOO⁻ - Radical peroxinitrito

RLU – Unidade de luz relativa

SDS – Dedocil sulfato de sódio

SOD - Superóxido desmutase

SSA – Ácido sulfosalicílico

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBAR - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloacético

TEA - Trietanolamina

TNB - Ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico

TROLOX - 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

VSV – Vírus da estomatite vesicular

γCGL - Gama-glutamil-cisteína sintetase

Capítulo 1- Introdução

I- INTRODUÇÃO

A inflamação é a resposta vascular e celular dos tecidos vivos à agressão. Essa agressão pode resultar em alterações passivas e químicas nas células ou tecidos agredidos, os quais desencadeiam o chamado processo inflamatório (Gomes-Leal, 2004).

A capacidade de desencadear uma resposta inflamatória é fundamental à sobrevivência, uma vez que é um processo protetor que preserva a integridade do organismo. Entretanto, em algumas situações e doenças, a resposta inflamatória pode ser exagerada e persistente (Carvalho e Silva, 2004), ocasionando erroneamente danos em diferentes biomoléculas incluindo DNA, proteínas, carboidratos, ácidos graxos e muitas outras estruturas celulares (Bagchi e Puri, 1998), resultando em um dano tecidual com conseqüente morte celular (Nordberg et al., 2001). Em virtude desses danos, muitos modelos de inflamação estão sendo estudados com o objetivo de descobrir mecanismos anti-inflamatórios capazes de modular essa resposta. Dentre estes modelos destaca-se o induzido por uma sobrecarga de Acetaminofeno (APAP) (Sidhartha et al., 2006).

O APAP, também conhecido como paracetamol, é uma droga analgésica e antipirética amplamente utilizada em todo o mundo. Em doses terapêuticas o APAP é rapidamente metabolizado no fígado, principalmente, através de glucoronidação e sulfatação, e uma pequena porção é oxidada pelo citocromo P-450. Em contrapartida, o uso excessivo deste fármaco leva a uma hepatotoxicidade, que está relacionada a um quadro de estresse oxidativo decorrente da superprodução de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Nitrogênio (ERN) durante a formação de N-acetil-p-benzoquinemina (NAPQI) pelo citocromo P450 (Dahlin et al., 1984; Yen et al., 2007).

O sistema imunológico é especialmente vulnerável a esses danos oxidativos, porque muitas células do sistema imune, tais como neutrófilos e macrófagos, também produzem espécies reativas como parte dos mecanismos de defesa do organismo para destruir patógenos invasores (Marin et al., 2010). Durante a ativação, os neutrófilos podem gerar e liberar quantidades extremamente elevadas de espécies reativas através do sistema da NADPH oxidase (Zieliska-Przyjemska et al., 2009), sendo este processo conhecido como “explosão respiratória”.

Diversos antioxidantes podem mitigar os efeitos danosos das espécies reativas. Pesquisas feitas com *Baccharis trimera* (carqueja), por exemplo, demonstram que esta

planta possui vários componentes bioativos, como flavonoides, diterpenos e triterpenos (Verdi et al., 2005). Os triterpenos, juntamente com um conjunto de saponinas descritos por Gené et al. (1996), têm sido relatados como os principais responsáveis pela atividade anti-inflamatória da planta (Della-Loggia et al., 1994; Akihisa et al., 1996), enquanto que os flavonoides, por possuírem ação antioxidante, têm sido relacionados à proteção do organismo contra os radicais livres (Rodrigues et al., 2009).

De fato, Leite et al. (2007) comprovaram a ação anti-inflamatória e citoprotetora do extrato aquoso de *B. trimera* após o tratamento de ratos com as doses de 800mg/kg e 1600mg/kg. Foi observado ao final do experimento, que ambas as concentrações promoveram uma diminuição na migração de leucócitos polimorfonucleares, sendo a dose de 1600mg/kg também eficiente para diminuir a migração de leucócitos totais.

Recentemente nosso grupo demonstrou, em resultados já publicados, a eficiência do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* na modulação de ERO produzidas por neutrófilos em um modelo de inflamação (Pádua et al., 2010). Considerando que os leucócitos polimorfonucleares são as células presentes em maior quantidade em um processo de inflamação aguda e que as espécies reativas produzidas durante a sua ativação e também através de outras importantes fontes endógenas, são características de processos patológicos em muitas doenças que acometem o fígado, o presente estudo teve como objetivo investigar, em neutrófilos e fígado de ratos intoxicados com APAP, o efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo oxidativo.

Vale ressaltar que a abordagem terapêutica para utilização de produtos naturais na medicina convencional ainda é uma conduta alternativa, e geralmente ignorada pela prática médica devido à falta de informações científicas e evidências clínicas (Fontanarosa e Lundberg, 1988; Yuan e Lin, 2000). Assim a utilização de modelos animais se torna essencial para validar cientificamente a eficácia e a segurança do uso terapêutico dos produtos naturais (Petronilho et al., 2012).

Capítulo 2- Revisão Bibliográfica

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – O Fígado

O fígado é o segundo maior órgão do corpo humano (Nagato et al., 2011) representando 2,5 a 4,5% da massa corporal total com um peso médio de 1500g. Esse órgão se localiza na cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, onde recebe 80% de sangue rico em nutrientes e pouco oxigenado, advindo da veia porta. Os outros 20% de sangue, que se caracteriza por ser rico em oxigênio, é fornecido pela artéria hepática. Esta particularidade permite ao fígado controlar as substâncias que são absorvidas em todo o intestino e determinar quais delas irão e como irão entrar na circulação sistêmica (Junqueira & Carneiro, 2008).

Os hepatócitos são as células mais importantes do fígado constituindo cerca de 2/3 da sua massa. Estas células se organizam em cordões entremeados pelos sinusóides, e se estendem do limite do lóbulo, onde se localizam os espaços porta, até o vaso central nomeado veia centrolobular. Os espaços porta contêm ramos da artéria hepática, veia porta e ducto biliar, sendo que o fluxo sanguíneo parte desta estrutura e segue em direção à veia centrolobular e vasos subseqüentes, chegando até a veia hepática e deixando o órgão (**Figura 1**) (Junqueira & Carneiro, 2008).

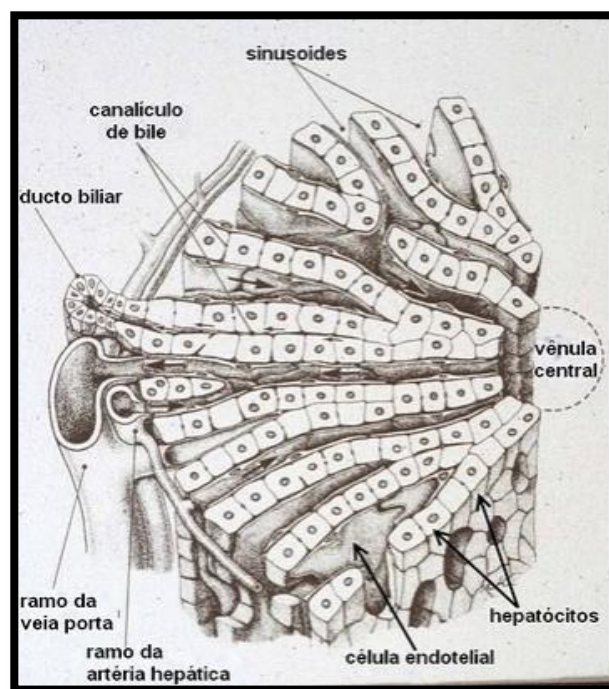


Figura 1 – Esquema de lóbulo hepático (FONTE: <http://www.teliga.net/2010/11/tecido-glandular-ou-secretor-principais.html>)

A organização funcional e fluxo sanguíneo único do fígado permitem que ele realize inúmeras atividades vitais, essenciais à manutenção da homeostasia corporal. Dentre elas estão funções metabólicas, catabólicas, excretoras, secretoras, de síntese e de armazenamento. O fígado é capaz de, por exemplo, controlar a homeostase de glicose, sintetizar albumina e fatores da coagulação, remover amônia do sangue, armazenar glicogênio, triglicerídeos, ferro e vitaminas, e sintetizar e secretar a bile. Além disso, o fígado, ou mais especificamente o hepatócito, é conhecido por sua notável capacidade de degradar e detoxificar compostos, tanto endógenos quanto exógenos. Nesta lista estão hormônios esteróides, proteínas séricas, fármacos, toxinas, contaminantes ambientais, álcool e até produtos de degradação bacteriana originados do trato gastrointestinal (Thomson e Knolle, 2010).

Considerando que muitas destas funções estão inter-relacionadas, é possível compreender o porquê da falência hepática ser responsável por milhares de mortes anualmente (Khan et al., 2006). Diversas podem ser as causas dessa falência, mas as principais são o uso de drogas/fármacos e infecções virais. Os vírus da hepatite A, B e C são os principais causadores de falência hepática em países em desenvolvimento, enquanto que a falência induzida por drogas/fármacos, dentre eles a hepatotoxicidade induzida pelo APAP, prevalece nos EUA e Europa (Berna et al., 2010).

Em decorrência dessa elevada taxa de mortalidade, o estudo de modelos que levam a uma hepatotoxicidade é de extrema importância, uma vez que irá possibilitar a descoberta de diferentes terapias que irão minimizar os danos provocados pelas inúmeras enfermidades que acometem o fígado.

2.2 – Modelo de Hepatotoxicidade induzido por APAP

A injúria hepática induzida por fármacos é um problema médico atual, uma vez que se tornou a principal causa de insuficiência hepática aguda em países ocidentais (Ostapowicz et al., 2002). De acordo com o “United States Acute Liver Failure Study Group”, a injúria hepática induzida por fármacos corresponde a mais de 50% dos casos de insuficiência hepática aguda, o que inclui a hepatotoxicidade causada por altas doses de APAP (39%) e a injúria hepática desencadeada por outras drogas (13%). O Food Drug Administration (FDA) recomenda uma dose de APAP para adultos de 325-650mg e para crianças menores que 12 anos de 10-15mg/kg/dose, ambas com intervalos de 4 - 6h. A dose diária limite para adultos é 4 gramas, ao passo que para crianças é 75mg/Kg.

Como se sabe, o APAP é uma droga analgésica e antipirética segura em doses terapêuticas. Contudo, em quantidades elevadas causa injúria no fígado e é a principal causa de falência hepática nos Estados Unidos e no Reino Unido (Larson et al., 2005; Ostapowicz et al., 2002). Quando administrado em doses terapêuticas, mas de 90% do APAP é glucoronidado ou sulfatado no fígado e, subsequentemente, excretado (Jaeschke e Bajt, 2006). O restante remanescente é metabolizado por uma terceira via metabólica na qual o APAP é bioativado pelo citocromo P450 (CYP450) no intermediário eletrolítico NAPQI (James et al., 2003), que pode ser metabolizado através de conjugação com a glutathiona (GSH) para gerar um produto não reativo solúvel em água, o ácido mercaptúrico.

Depois de uma elevada dose de APAP a capacidade para glucoronidação e sulfatação é excedida (Slattery e Levy, 1979; Prescott, 1980) e uma grande quantidade de NAPQI é formada via citocromo P450 (Hjelle e Klaassen, 1984), resultando em uma rápida depleção nas concentrações de GSH (Mitchell, et al., 1973). Subsequentemente, NAPQI se liga covalentemente no DNA e em proteínas, especialmente as mitocondriais, presentes nas células hepáticas parenquimais, resultando em uma injúria hepática (Corcoran, et al., 1980; Holme, et al., 1984) (**Figura 2**). A consequente disfunção mitocondrial leva a inibição da respiração intracelular, depleção de ATP e formação de ERO, tais como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HO^{\bullet}) e também de ERN, como óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) dentro da mitocôndria (James, et

al., 2003; Kon et al., 2004; Reid, et al., 2005). O estresse oxidativo gerado nesse processo possui relação direta com a morte de hepatócitos (Kim et al., 2003).

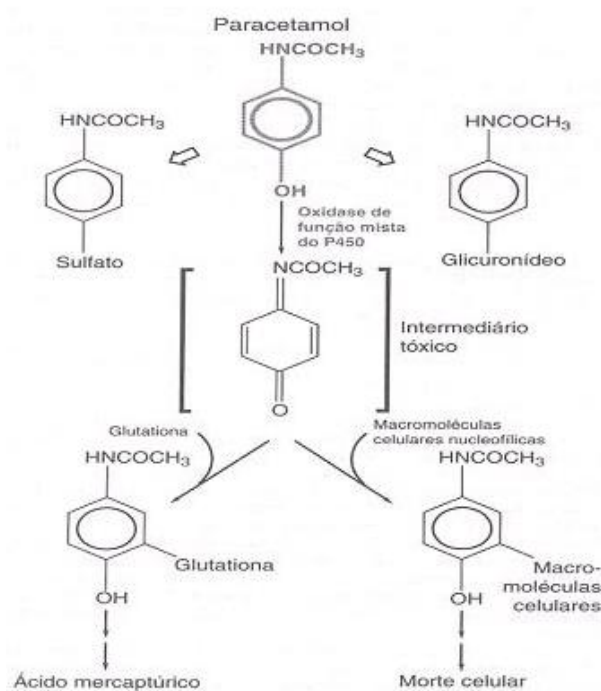


Figura 2 – Metabolização hepática do paracetamol. Fonte: Gilmar, 2001.

A participação do sistema imune também é evidente durante a sobrecarga de APAP. Muitos estudos emergentes tem discutido o papel patofisiológico de células do sistema imune inato, tais como as células de Kupffer e os neutrófilos na hepatotoxicidade induzida por APAP (Hinson, et al., 2010; Ishida, et al., 2002). As células de Kupffer são macrófagos presentes no fígado que são ativadas cerca de 1 a 2 horas após a overdose de APAP. Liu et al., (1995) ao utilizar um composto que inibe a produção de espécies reativas pelas células de Kupffer, observou uma atenuação da injúria hepática induzida pelo APAP após 24 horas. Porém, trabalhos como os de Bautista, et al., (1990), Jaeschke, et al., (1991) e James, et al., (2003) mostram que os oxidantes formados pelas células de Kupffer não estão relacionados com hepatotoxicidade, mas com a regulação de genes cito protetores. A explicação mais provável para isto está relacionada com a capacidade das células de Kupffer em produzir muitas citocinas, dentre elas interleucina 10 (IL-10), que tem sido associada à proteção contra a toxicidade induzida por APAP por regular negativamente a expressão de iNOS e a formação de peroxinitrito (Bourdi et al., 2002). Quanto aos neutrófilos, também existem diversas discussões em relação ao seu papel na patofisiologia da hepatotoxicidade induzida por APAP.

Como se sabe, os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares formados na medula óssea. Eles têm um papel crucial na defesa do organismo contra bactérias, fungos e protozoários, constituindo a principal célula efetora da imunidade inata. Em resposta a um patógeno invasor, os neutrófilos migram para o tecido afetado, formando a primeira linha de defesa do organismo contra infecções (Faurichou et al., 2003 e Nathan, 2006). Quando ativados sofrem uma “explosão respiratória”, durante a qual uma grande quantidade de oxigênio é convertida em $O_2^{\bullet-}$, pela ação da enzima NADPH oxidase (Babior, 1994; Graham et al., 2007).

Outras espécies reativas decorrentes dessa “explosão respiratória” são as ERN originadas a partir da reação do óxido nítrico com o ânion superóxido, formando assim o peroxinitrito. Este, juntamente com o óxido nítrico e as outras ERO, são potentes agentes tóxicos produzidos pelos neutrófilos, sendo capazes de matar os microrganismos fagocitados e, quando liberados no meio extracelular, também causar lesões oxidativas aos tecidos do hospedeiro (Hampton et al., 1998; Meguro et al., 2003). Foi demonstrado que o processo inflamatório gerado após a sobrecarga de APAP promove o recrutamento de neutrófilos para o fígado (Dambach et al., 2002; Holt et al., 2008; Lawson et al., 2000). No entanto, a contribuição dos neutrófilos na lesão hepática é ainda controversa (Jaeschke, 2008).

Alguns estudos, que utilizaram neutropenia induzida por anticorpos que foram aplicados 24h antes da administração de APAP, forneceram evidências para o envolvimento dos neutrófilos no processo de lesão do fígado (Ishida et al., 2006; Liu et al., 2006; Marques et al., 2012). No entanto, outros trabalhos mostraram que em animais tratados com o mesmo tipo de anticorpo, logo após a administração de APAP, a neutropenia não foi capaz de proteger o fígado contra os danos causados por este fármaco (Cover et al., 2006). A razão para estes resultados contraditórios usando o mesmo anticorpo foi a de que a fagocitose de neutrófilos inativados provocou a ativação de células de Kupffer (Bautista et al., 1994) e desencadeou uma resposta de estresse nos hepatócitos. Isso levou a uma ativação de genes inflamatórios e de genes de proteção (Jaeschke and Liu, 2007) que fizeram com que os hepatócitos, de animais pré-tratados com este anticorpo indutor de neutropenia, fossem mais resistentes à toxicidade induzida pelo APAP, independente da falta de neutrófilos no sangue.

Além desses dados, Willians et al., (2014), ao estudar a ativação de neutrófilos durante a hepatotoxicidade induzida por APAP, demonstrou que a

produção de espécies reativas mediada pela NADPH oxidase não é um evento crítico durante a lesão hepática causada por este fármaco. Em contrapartida, eles demonstraram que os neutrófilos presentes no sangue periférico são ativados após a administração de APAP e que o processo de fagocitose decorrente dessa ativação está relacionado com a remoção dos restos celulares durante o processo de regeneração hepática. Dessa forma, a produção de espécies reativas pela NADPH oxidase durante a ativação dos neutrófilos pode funcionar na sinalização metabólica e, em grandes quantidades, pode atuar provocando danos oxidativos nas células (Zalba et al., 2001).

O desequilíbrio formado entre a geração dessas espécies reativas e as defesas antioxidantes resulta em um quadro conhecido como estresse oxidativo (Sies, 1985), que por sua vez, está diretamente envolvido na instalação de várias doenças hepáticas inflamatórias, incluindo isquemia e reperfusão hepática (Jaeschke et al., 1990), endotoxemia, hepatite alcoólica (Bautista, 1992), sepse (Molnar et al., 1997) e exposição a compostos químicos como o α -naphthylisothiocyanate (Dahm et al., 1991).

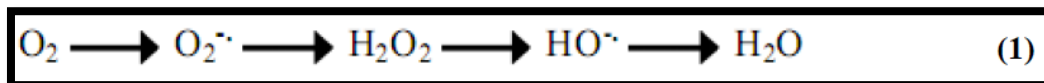
2.3 – Espécies Reativas e Estresse Oxidativo

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios, utilizada tanto na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos, como na membrana celular de muitas bactérias, e em inúmeras vias metabólicas fundamentais (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A ideia de que o oxigênio pode causar danos ao organismo não é recente, trabalhos pioneiros que atribuíram toxicidade ao oxigênio foram realizados por John Bean e Paul Bert há mais de meio século (Bean, 1945; Bert, 1943). Em 1956, Denham Harman sugeriu que radicais livres estariam envolvidos em eventos fisiológicos, particularmente, no processo de envelhecimento (Harman, 1956). Esta hipótese inspirou numerosos estudos que contribuíram para o conhecimento atual sobre radicais livres e espécies reativas derivadas do oxigênio. Embora os radicais livres já sejam conhecidos há várias décadas, indiscutivelmente, nos últimos anos, eles têm ganhado notoriedade nas diversas áreas do conhecimento médico, em função de sua efetiva associação com diversos processos fisiopatológicos de grande importância.

De fato, devido à sua alta reatividade química as espécies reativas podem atuar modificando os componentes celulares como lípidios, ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos. Além disso, estas espécies reativas podem comprometer a função mitocondrial, levando à alterações morfológicas (Cadenas, 1995). Estas alterações são provocadas devido à formação do $O_2^{\bullet-}$ a partir da redução do oxigênio pela transferência de um único elétron, ou da formação de H_2O_2 pela transferência de dois elétrons ou, ainda, pela formação do HO^{\bullet} e do oxigênio “singlet” (Cadenas, 1995).

Apesar da diversidade de espécies reativas existentes, a principal fonte celular de ERO é a cadeia respiratória mitocondrial, onde ocorre a redução unieletrônica do oxigênio molecular a água, na qual a entrada de 4 elétrons na molécula de oxigênio promove a formação de intermediários reativos, conforme mostrado na equação 1.



São consideradas ainda, quatro importantes fontes endógenas de oxidantes: a β -oxidação peroxissomal de ácidos graxos de cadeia muito longa, onde há liberação de H_2O_2 como um subproduto, que é degradado por ação da enzima catalase (CAT). Evidências sugerem que, sob certas condições, peróxidos escapam dessa degradação resultando em sua liberação em outros compartimentos celulares (Beckman e Ames, 1998). Uma segunda fonte seria a reação de Fenton, que é uma das formas mais simples de gerar o radical HO^{\bullet} a partir da decomposição do H_2O_2 catalisada pelo ferro (Fe^{+2}) presente em um meio ácido (Villa e Nogueira, 2005). Uma terceira fonte seria a eliminação de subprodutos do metabolismo das enzimas do sistema citocromo P450 (Ames et al., 1993). E uma quarta fonte seria a partir da atividade celular fagocítica, que produz uma mistura de oxidantes (NO , $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2) em resposta a estímulos, como em infecções causadas por vírus, bactérias e outros parasitas (Ames et al., 1993).

No modelo de hepatotoxicidade induzido por APAP, a principal fonte geradora de espécies reativas é a do citocromo P450. O termo citocromo P450 engloba uma família de enzimas pertencente ao grupo das heme-proteínas que estão presentes primariamente ancorados na bicamada lipídica do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos. Estas enzimas estão diretamente envolvidas na conversão de compostos insolúveis como fármacos ou outras moléculas em substâncias

hidrossolúveis, facilitando assim sua excreção por via urinária, bile, suor, leite ou saliva (Devlin, 2002; Goodman e Gilmar, 1992). Isto faz do fígado o principal local de biotransformação farmacológica no organismo humano, pois contém os principais citocromos processadores de xenobióticos (Bibi, 2008; Guengerich, 1992; Galli e Feijoo, 2002; Nuñez 1999, Santiago 2003).

A metabolização de drogas pelos citocromos faz-se mecanisticamente pela inserção de um átomo proveniente do oxigênio molecular (monoxigenação) na molécula do fármaco com o objetivo de hidrossolubilizar o composto para facilitar sua excreção. A reação é iniciada quando o substrato se liga ao ferro heme da enzima. Isso leva a uma alteração conformacional na enzima que, conseqüentemente, leva a um aumento no potencial de redução da molécula do fármaco, permitindo assim, que esta seja reduzida pelo recebimento inicial de um elétron em sua molécula. (Devlin, 2002). Elétrons não podem ser transferidos quando o substrato se encontra ausente porque o potencial de redução é termodinamicamente desfavorável. O recebimento deste elétron faz com que o íon férrico do grupo heme se reduza para íon ferroso o que permite a fixação do oxigênio molecular facilitando a transferência de um segundo elétron. O recebimento de um segundo elétron leva a ativação do oxigênio molecular, este se cliva permitindo assim que um átomo de oxigênio seja inserido no substrato, e o outro se combine com prótons e dois elétrons para formar água. Os dois elétrons requeridos pela enzima para a reação de monoxigenação são doados pela coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) em seu estado reduzido (Devlin, 2002; Galli e Feijoo, 2002).

Como a solubilização envolve modificações químicas na molécula, uma consequência da biotransformação de xenobióticos é a ativação ou inativação de agentes terapêuticos, aumentando ou diminuindo sua eficácia, bem como a conversão de moléculas inertes em espécies químicas altamente reativas que podem causar dano celular/tecidual indesejado. (Devlin, 2002; Goodman e Gilmar, 1992). Esses metabólitos tóxicos podem formar ligações covalentes e/ou não-covalentes, dentre elas, a peroxidação lipídica, a produção de espécies reativas e as reações causadoras de alterações na concentração de glutatona e modificação de grupos sulfidrila (Park et al., 2005).

O APAP exemplifica vários dos mecanismos gerais de lesão celular, tanto para interação covalente como para as não-covalentes. Seus metabólitos podem ativar uma resposta imune no fígado promovendo a ativação das células de Kupffer e

o recrutamento dos macrófagos, neutrófilos e outras células do sistema imune que resultam em um quadro de inflamação e lesão hepática causada pela liberação de citocinas (Bruchfeld et al., 2000). Esses eventos são importantes na iniciação e manutenção da injúria hepática induzida por drogas (Campos-Franco et al., 2004).

Em relação às células fagocíticas recrutadas durante a hepatotoxicidade induzida pelo APAP a produção de espécies reativas por elas é efetuada principalmente por um sistema dependente de enzima. A enzima responsável pela produção destas espécies, durante a explosão respiratória, é conhecida como NADPH oxidase (**Figura 3**).

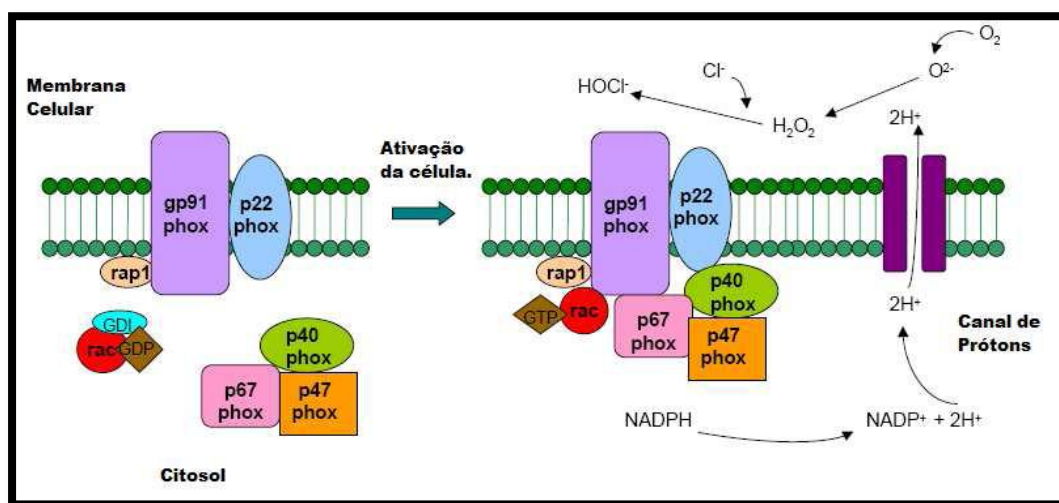


Figura 3 – Complexo NADPH oxidase. (Fonte: Assari, et al., 2006)

Em células não estimuladas, a NADPH oxidase é formada por um componente associado à membrana, o citocromo b558 constituído de duas subunidades gp91^{phox} e p22^{phox} e por três componentes citosólicos p47^{phox}/p67^{phox}/p40^{phox} formando um complexo (Forman et al., 2001). A glicoproteína gp91^{phox} contém dois hemes e um sítio de ligação ao NADPH que interage com p22^{phox} para formar o complexo do citocromo b558 (Brahm et al., 2012)

A ativação dos polimorfonucleares conduz a translocação de GTPase Rac, p47^{phox} e p67^{phox} para a membrana plasmática, onde p67^{phox} interage através de seu domínio de ativação com as subunidades ligadas a membrana. Esta interação é requerida para a ativação da oxidase e facilita a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio. Duas proteínas adicionais têm sido demonstradas interagir com o citocromo b558: rap1a e p40^{phox}, estando envolvidas no recrutamento de p47^{phox} e p67^{phox} para a membrana (Brandes et al., 2005).

Uma vez ativada, a NADPH oxidase catalisa a redução de oxigênio a $O_2^{\bullet-}$ pela doação de um elétron, à custa do NADPH (Babior, 1994).



Além do $O_2^{\bullet-}$ os neutrófilos também são capazes de produzir e liberar óxido nítrico. O NO é um radical gasoso que, dependendo do contexto, pode agir na sinalização celular ou citotoxicamente nos mecanismos de defesa, além de participar de processos inflamatórios e infecciosos (Bentz et al., 2002, Bank et al., 1993). Existem três enzimas produtoras de NO que são as óxido nítrico sintases (NOS): nNOS (neuronal), eNOS (endotelial) e a iNOS (induzida ou inflamatória). Esta enzima remove, oxidativamente, o nitrogênio terminal do grupo guanidino da L-arginina, para formar citrulina e NO (**Figura 4**) (Knowles e Mocada, 1994).

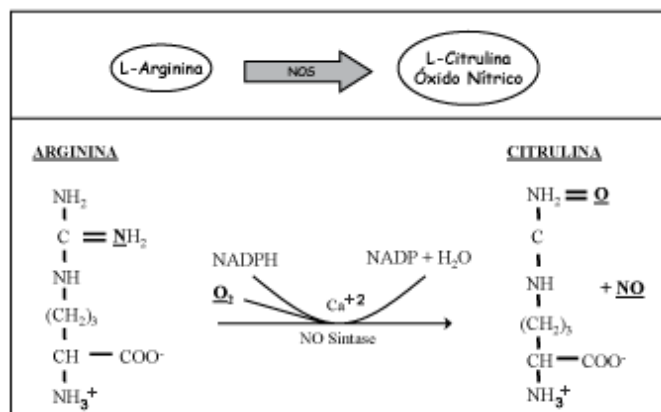


Figura 4 – Formação do óxido nítrico a partir da L-arginina (Fonte: Lehninger, 2002.)

O NO produzido pelo sistema NOS está relacionado com a modulação do tônus vascular, a morte de parasitas dependente de macrófagos e, possivelmente, de células cancerosas, além de participar dos processos inflamatórios (Coffey et al., 2001; Bentz et al., 2002). Em contextos diferentes, o NO pode agir na transdução de sinais ou como molécula citotóxica nos mecanismos de defesa (Mustafa et al., 2001).

A toxicidade do NO é dependente da sua concentração e do microambiente no qual ele é produzido. Embora seja considerado por muitos autores como uma molécula pouco reativa, o NO é capaz, assim como o $O_2^{\bullet-}$, de gerar moléculas de maior reatividade, que assim como o próprio NO, desempenham importante papel nas reações inflamatórias e no combate às infecções (Coffey et al, 2001).

A geração de ERN é, na maioria das situações, decorrente da interação do próprio NO com moléculas que tenham caráter de radical. O oxigênio molecular e

seus intermediários reativos são capazes de reagir com o NO, logo, a disponibilidade de ERO pode ser um fator determinante na ação do NO como molécula citotóxica, sugerindo a possibilidade de um balanço entre as ERO e NO (Darley-Usmar et al, 1995).

Assim, tem-se tornado de grande importância a avaliação do balanço ERO/NO, uma vez que, quando há um desequilíbrio na produção de ERO, estas espécies reagem com o NO produzindo ONOO-, que é um composto instável e, por isso, capaz de formar espécies ainda mais danosas às células (Darley-Usmar et al., 1995; Kaminski et al., 2001).

Esse desequilíbrio no balanço ERO/NO associado a uma falha das defesas antioxidantes pode gerar um quadro conhecido como estresse oxidativo, que é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante em neutralizá-las e prevenir seus efeitos deletérios (Sies 1986). Porém, baseado no papel das ERO/NO sobre as diversas vias de sinalização celulares, recentemente, foi proposto um novo conceito de estresse oxidativo, sendo este caracterizado por uma “disfunção da sinalização redox e dos mecanismos de controle” (Jones 2006). Então, para que prevaleça o equilíbrio homeostático e as funções biológicas sejam preservadas, é necessário que o organismo controle a presença de ambos, oxidante e antioxidante, continuamente (Sies, 1993).

2.4 – Defesas Antioxidantes

Uma substância antioxidante seria aquela capaz de inibir a oxidação. Ou seja, é uma molécula estável o bastante para doar um elétron a uma espécie reativa, neutralizando-a e reduzindo sua capacidade de danificar biomoléculas (Bagchi e Puri, 1998). Entretanto, dada a complexidade dos mecanismos antioxidantes desenvolvidos ao longo da evolução, utiliza-se com frequência a expressão “sistema antioxidante” já que há antioxidantes diferentes favorecendo a manutenção da homeostase do estado redox do corpo, através de mecanismos distintos (Berry e Kohen, 1999).

A definição de antioxidantes tem sido baseada em parâmetros distintos na literatura, pois antioxidantes podem diferir quanto ao local de ação, ao mecanismo, à composição e às propriedades físico-químicas. Uma definição ampla e mais recente é

a que considera antioxidante como uma substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula alvo (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Dessa forma, para prevenir ou reduzir os efeitos do estresse oxidativo, o organismo está equipado com diversos mecanismos de defesa antioxidante (**Tabela I**), tais como a presença dos antioxidantes não enzimáticos (β -caroteno, selênio, α -tocoferol, vitamina C e E, compostos fenólicos, etc.) e antioxidantes enzimáticos formados pela superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e CAT que neutralizam ou reduzem a ação das ERO antes que estes possam prejudicar o organismo (Cai e Harrison, 2000).

Tabela I – Antioxidantes de baixo peso molecular e seus principais alvos.

Antioxidante	Alvo	Referência
Ascorbato	$1O_2$, $\bullet OH$, $O_2\bullet$, $HO_2\bullet$, $RO_2\bullet$, $RO\bullet$	Carr e Frei, 1999
Carotenóides Tocoferóis	$1O_2$, $RO_2\bullet$, $\bullet OH$, $HClO$, $ROO\bullet$, $1O_2$	Paiva e Russel, 1999 Halliwell e Gutteridge, 1999
Flavonóides	$1O_2$, $\bullet OH$, $O_2\bullet$, metais de transição	Barreiros et al., 2006
GSH	$HClO$, $RO_2\bullet$, $RO\bullet$, $1O_2$	Blokhina et al., 2003
Bilirrubina	Peroxil, $1O_2$	Neuzil e Stocker, 1993
Melatonina	$\bullet OH$, $1O_2$, $O_2\bullet$	Karbownik e Reiter, 2000
Ácido úrico	$1O_2$, $RO_2\bullet$, $\bullet OH$	Ames et al., 1981

Os antioxidantes enzimáticos são produzidos endogenamente e fazem parte de um complexo sistema de detoxificação de três fases, altamente conservado entre eucariotos. As proteínas de detoxificação envolvidas neste processo são classificadas em Fases I, II e III. (Sarkadi et al., 2006). A citocromo P450 monooxigenase (CYP) é a principal enzima envolvida na Fase I do metabolismo xenobiótico. Uma rede de enzimas detoxificadoras, tais como SOD, CAT, GPx e glutathione transferase (GST) fazem parte da Fase II. Finalmente na Fase III de detoxificação, os conjugados tóxicos são bombeados para fora da célula por transportadores cassetes de ligação de ATP (Transportador ABC) ou outros transportadores (Sarkadi et al., 2006).

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. As SODs catalizam a dismutação de um elétron do $O_2\bullet^-$ para o H_2O_2 e o O_2 (Fridovich, 1997). Em pH fisiológico, a taxa de dismutação

não-enzimática de $O_2^{\bullet-}$ é grande, mas esta taxa é bem maior na presença das SODs (Forman e Fridovich, 1973).

Nos sistemas eucariontes existem três formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco (Cu/Zn-SOD) que está presente principalmente no citoplasma e nos fluidos extracelulares, a SOD-manganês (Mn-SOD) que está localizada principalmente nas mitocôndrias, enquanto que a SOD extracelular é exclusiva dos fluidos extracelulares (Winterbourn e Kettle, 2003, Marklund et al., 1982).

A GPx é uma enzima antioxidante dependente de selênio que catalisa a redução do H_2O_2 e de outros peróxidos orgânicos, às custas da conversão da glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona oxidada (GSSG) e água e peróxidos orgânicos a álcool. Assim, a GPx desempenha um papel importante na inibição de processos degenerativos como a peroxidação lipídica e na prevenção de danos causados ao DNA pelas ERO (Martins, 2007).

A CAT é uma hemoproteína citoplasmática localizada nos peroxissomos do fígado e rins e em microperoxissomos de outras células, essa enzima catalisa a redução do H_2O_2 a água (H_2O) e oxigênio (O_2) (Rojkind et al., 2002) (**Figura 5**).

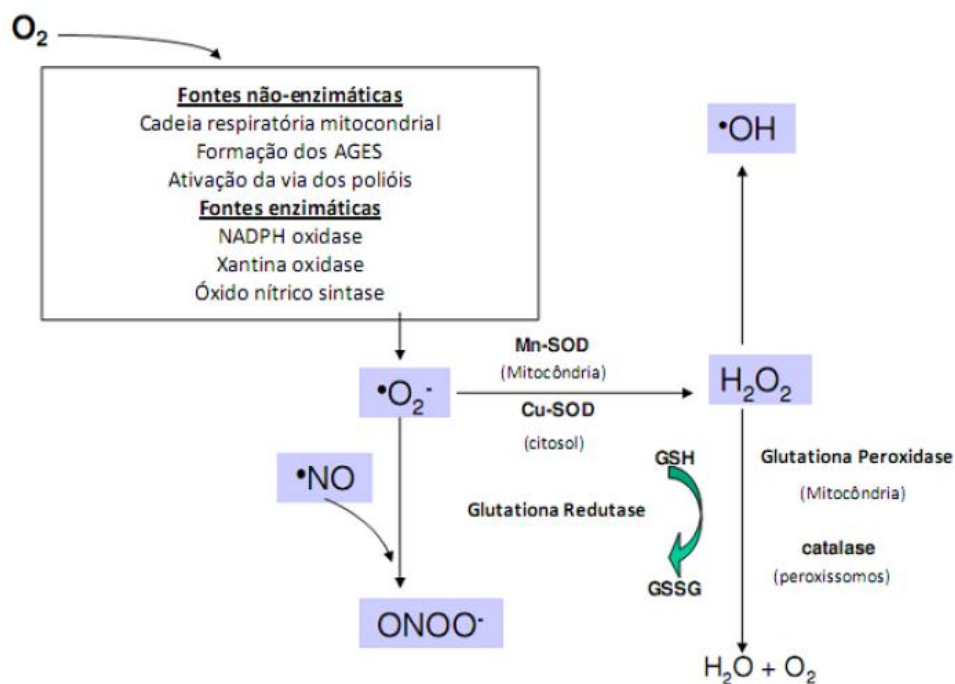


Figura 5. Formação de espécies reativas e ação de enzimas antioxidantes. O oxigênio é convertido ao ânion superóxido, através da ativação das vias enzimáticas e não enzimáticas, este por sua vez é dismutado em H_2O_2 pela ação da SOD. O H_2O_2 é convertido em água através de reação catalisada pela catalase ou glutaciona peroxidase. A GSH é reciclada pela ação da glutaciona redutase (GR). O ânion superóxido, quando não é neutralizado pode reagir com o óxido nítrico e formar o $ONOO^-$ - uma espécie não radicalar, mas muito reativa. Fonte: Adaptado de Johansen et al. (2005).

Em suma, para ser considerado um bom antioxidante, uma substância deve apresentar algumas características essenciais, como: extinguir especificamente espécies reativas ou contribuir para que tal ocorra; interagir com outros antioxidantes dentro da “rede de antioxidantes”; apresentar efeito positivo na expressão de genes que codificam produtos antioxidantes; ser absorvido prontamente, no caso dos exógenos; ter uma concentração em tecidos e biofluidos a um nível fisiologicamente pertinente; trabalhar em ambos os domínios de membrana e efetivamente evitar danos por ação de espécies reativas (Barreiros et al, 2006).

Na tentativa de descobrir antioxidantes que apresentem todas essas características citadas, aumentou-se progressivamente o interesse na busca de compostos antioxidantes naturais para substituir os antioxidantes sintéticos, os quais têm seu uso restrito devido a alguns serem carcinogênicos (Ito et al., 1983; Zheng e

Wang, 2001). Nesse contexto, muitas plantas utilizadas na medicina popular vêm sendo estudadas, uma vez que os seus compostos naturais, por apresentarem ação antioxidante, podem proteger o corpo humano dos radicais livres e retardar a progressão de muitas doenças crônicas (Pryor, 1991; Kinsella et al., 1993; Lai et al., 2001; Rahman, et al., 2006).

2.5 – *Baccharis trimera* e sua utilização como planta medicinal

Atualmente o consumo de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo. Dados mostram que cerca de 80% da população mundial já fizeram uso de algum tipo de erva na busca de alívio para sintomatologia dolorosa ou desagradável (Mangiaterra, 2005). Segundo Martins et al., (2000), são muitos os fatores que vêm colaborando no desenvolvimento de práticas de saúde que incluam plantas medicinais, dentre eles, destacam-se principalmente, os fatores econômicos e sociais.

As plantas medicinais são plantas que possuem substâncias biologicamente ativas, podendo assim, serem utilizadas na fitoterapia, já que essa defende o tratamento de doenças a partir de medicamentos preparados com base em substâncias vegetais ou princípios delas extraídos (Mangiaterra, 2005).

Com o objetivo de comprovar as ações terapêuticas dos fitoterápicos várias espécies vegetais estão sendo pesquisadas, dentre elas as da família Asteraceae, que é o grupo sistemático mais numeroso dentro da divisão Angiosperma, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies (Verdi et al., 2005).

As Asteraceae são plantas de aspecto extremamente variado incluindo, principalmente, pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Cerca de 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte e são encontradas em todos os tipos de habitats, mas principalmente, nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (Verdi et al., 2005). Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto à sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros.

O gênero *Baccharis*, pertencente à família das Asteraceae, está representado por mais de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas. A alta concentração de espécies no Brasil e nos Andes indica que uma dessas áreas é o provável centro de origem desse gênero. No Brasil estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, com a maior parte

delas localizadas na região sudeste do país principalmente nos campos de altitude, onde formam subarbustos perenes de 50 a 80 cm de altura, muito ramificados na base e com ramos de expansões trialadas (Lorenzi e Matos, 2002).

Muitas das espécies pertencentes a este gênero são utilizadas na medicina popular para o tratamento de males do estômago, desordens hepáticas e renais, atividades antivirais, anti-inflamatória e antimicrobiana e na produção de fragrâncias comerciais (óleo de carqueja) (Soicke and Leng-Peschlow, 1987). Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e/ou atividade biológica, encontra-se *Baccharis trimera*.

B. trimera (**Figura 6**) é uma planta subarbusciva, dióica, aromática, com altura variável entre 1,0 e 1,6 m (Castro e Ferreira, 2000). É uma espécie de elevada rusticidade (Castro e Ferreira, 2000) que cresce bem em condições de pleno sol (Bona, 2002), sendo típica de lugares abertos ou de campo (Oliveira et al., 1999). É considerada invasora de pastagens, ocorrendo em solos pedregosos, margens das estradas, barrancos ou lugares úmidos nas ribanceiras dos rios (Correa Júnior et al., 1994). Adapta a solos pobres e ácidos apresentando resistências às geadas (Vichnewski et al., 1990), além de ser altamente tolerante à presença de cobre no solo (Weber et al., 2005).



Figura 6: Foto da espécie de *B. trimera*. (Fonte: www.rain-tree.com/Carqueja-powder.htm)

No Brasil, o primeiro registro desta planta como uso medicinal foi efetuado por Correa em 1931, que escreveu sobre o uso da sua infusão no tratamento da esterilidade feminina e impotência masculina (Lorenzi e Matos, 2002). Atualmente, na medicina popular a carqueja é usada como diurética, tônica, digestiva (Carneiro e Fernandes, 1996), protetora e estimulante do fígado, antianêmica, antirreumática, depurativa, para o controle da obesidade, diabetes, hepatite e gastro-enterites (Castro e Ferreira, 2000).

Muitos outros trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de comprovar os efeitos biológicos atribuídos à *B. trimera*, dentre eles podemos destacar o trabalho de Abad et al. (1999), no qual os autores avaliaram extratos aquosos e etanólicos de sete espécies de planta usadas como medicamento na Bolívia para testar a atividade antiviral contra o herpes tipo I (HSV-1), vírus de estomatite vesicular (VSV) e polivírus do tipo I. Os extratos aquosos da maioria das espécies investigadas mostraram possuir atividade antiviral, sendo que a *Satureja boliviana* e *B. trimera* foram ativas contra dois vírus diferentes (HSV-1 e VSV). Este efeito antimicrobiano foi confirmado por Avancini et al. (2000) que sugeriram a possibilidade da utilização de *B. trimera* como desinfetante e anti-séptico em problemas relacionados aos ambientes de produção animal, mais especificamente aqueles causados por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis*. Por sua vez, Olivera et al., (2012) demonstraram, através de um ensaio *in vitro*, a capacidade esquistosomicida de óleos essenciais presentes em *B. trimera*. Ao incubar fêmeas e machos causadores da esquistossomose em meio contendo óleos essenciais, os pesquisadores observaram uma elevada taxa de mortalidade e alterações relacionadas a parâmetros morfológicos e de motilidade, que em conjunto, destroem o agente etiológico da doença.

Somados a estes estudos estão os trabalhos de Coelho et al. (2004) que evidenciaram um efeito terapêutico antiartrítico da carqueja (*B. genistelloides*) usando o colágeno para induzir o modelo de artrite e os trabalhos recentes de Oliveira et al., 2013, que demonstraram o efeito anti-proliferativo de compostos fenólicos e terpenóides de *B. trimera* sobre o câncer cervical humano, de Biondo et al. (2011) que descobriram um efeito regulatório da secreção gástrica exercido por um extrato aquoso de *B. trimera* e os de Rodrigues et al. (2009) que atribuíram à carqueja efeitos antioxidantes e antiinflamatórios, respectivamente. Recentemente nosso grupo demonstrou, em resultados já publicados, a eficiência do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* em neutralizar as EROs produzidas por neutrófilos em um modelo de inflamação (Pádua et al., 2010). De fato *B. trimera* destaca-se por sua atividade antioxidante e antiinflamatória.

Lima et. al. (2004) relataram que o chá é referido na literatura como uma das melhores fontes de compostos fenólicos, uma vez que possui uma grande quantidade de flavonoides.

Sob o ponto de vista farmacológico, foram identificados inúmeros princípios ativos em *B. trimera*, dentre eles: flavonóides (apigenina, cirsiol, cirsimantina, eriodictiol, eupatrina e genkawanina), sesquiterpenos, diterpenos, lignanos, alfa e beta pinenos, canfeno, carquejol, acetato de carquejila, ledol, alcóois sesquiterpênicos, sesquiterpenos bi e tricíclicos, calameno, elemol, eudesmol, palustrol, nerotidol, hispidulina, campferol, quercetina, rutina e esqualeno (Bionatus, 2001 e Sanrisil, 2001). Dentre os princípios ativos acima descritos, os que se destacam sob o ponto de vista de definição do perfil sensorial da carqueja são os flavonóides. Esta classe de pigmentos vegetais são encontrados com grande frequência na natureza, sendo que as flavonas e/ou flavonóis (apigenina, quercetina e campferol), apresentam um gosto amargo bem característico de extratos e chás feitos com *B. trimera*. (Bobbio e Bobbio, 1989; Fennema, 1993).

A pesar dos flavonoides estarem presentes em diversas espécies do gênero *Baccharis* e de serem os principais responsáveis pelos efeitos biológicos atribuídos a essas plantas, muito outros compostos fenólicos (taninos e saponinas), alcalóides e isoprenóides (diterpenos e triterpenos) com funções ainda não elucidadas totalmente, estão sendo descritos para *B. trimera* (Simões-Pires et al., 2005; Verdi et al., 2005; Silva et al., 2007; Lago et al., 2008). Nogueira et al, (2011), por exemplo, ao comprovar o efeito antiinflamatório de *B. trimera* em um modelo de carragenina, observou um efeito genotóxico (*in vivo*) e toxicológico (*in vitro*) em células renais de camundongos que receberam doses elevadas do extrato. Resultados assim reforçam a importância de se estudar as plantas medicinais que são utilizadas pela população, uma vez que esses estudos, além de identificarem diferentes compostos, são úteis para estabelecer critérios relacionados à dose e ao tempo de tratamento, que em conjunto, impedem o acúmulo de ervas medicinais no organismo e, conseqüentemente, possíveis danos relacionados a esse excesso.

2.6 – Flavonoides

Os flavonoides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular, e que possuem em sua estrutura química anéis aromáticos, tendo como base o 2-fenil-benzopirano ($C_6-C_3-C_6$) (**Figura 7**) (Aherne e O'brien, 2002).

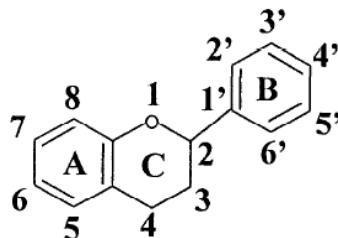


Figura 7 – Estrutura geral dos flavonóides. Fonte: Cook e Samman, 1996.

Mais de 6.000 diferentes tipos de flavonóides extraídos de plantas já foram descritos na literatura. As atividades bioquímicas destes compostos fenólicos dependem principalmente da sua estrutura química, e é a partir dela que os flavonoides também são classificados. As principais classes de flavonoides incluem: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, dihidroflavonóis e chalconas. Muitos flavonóides ocorrem naturalmente nas plantas acompanhados por glicídios, como a D-glicose, galactose, lignina e arabinose, recebendo a denominação de glico-flavonóide. Quando se apresentam isentos de glicídios, a estrutura recebe o nome de aglicona (Calabro et al., 2004).

Tem sido demonstrado que polifenóis, principalmente da classe dos flavonoides, são capazes de estimular a transcrição de enzimas do sistema de defesa antioxidante, através da ativação do Elemento de Resposta Antioxidante (ARE) pelo fator de transcrição Nrf2 (fator nuclear derivado de eritróide 2) (Masella et al. 2005). Nrf2 se localiza no citoplasma em um complexo inativo ligado a proteína repressora Keap1 (*Kelch-like ECH associating protein 1*), que apresenta muitos resíduos de cisteína, estes atuam como sensores do estado redox celular (Surh, 2008).

Os mecanismos que parecem estar envolvidos na estabilização de Nrf2 e rompimento de sua ligação a Keap1 incluem, fosforilação de resíduos de serina e treonina em Nrf2 e oxidação ou modificação covalente de resíduos de cisteína em Keap1. Nrf2 por sua vez pode sofrer translocação para o núcleo e formar um heterodímero com outros fatores de transcrição, tais como Maf, e se ligar a sequências regulatórias de ARE, na região promotora de diversos genes alvo, ativando sua transcrição (Itoh et al., 1997).

O modo exato da ação dos polifenóis na ativação de ARE permanece desconhecido. Acredita-se que polifenóis podem influenciar a ativação de ARE, por modificar a capacidade de ligação de Keap 1 a Nrf2, ou mesmo através da ativação de proteínas MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógeno), envolvidas na fosforilação e consequente estabilização de Nrf2 (**Figura 8**). Dentre os genes alvo que apresentam a sequência de ARE na região promotora, encontram-se o gene da γ -GCS (Chan e Kwong 2000), GPx, SOD, CAT e GST (Kong et al. 2001).

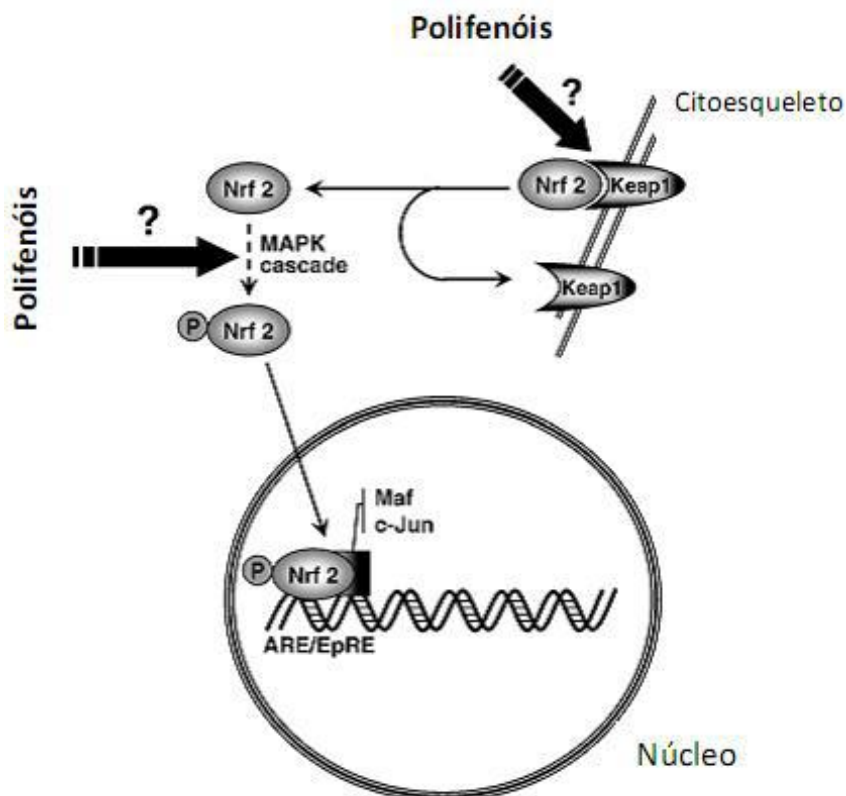


Figura 8. Indução da transcrição gênica de enzimas antioxidantes por polifenóis, através da ativação do Elemento de Resposta Antioxidante (ARE) mediada fator de transcrição Nrf2. Polifenóis podem (i) modificar a capacidade de Keap 1 em sequestrar Nrf2 e ou/ (ii) ativar proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) provavelmente envolvidas na estabilização de Nrf2. Nrf2 pode então sofrer translocação para o núcleo e ativar a expressão de enzimas antioxidantes através da ligação a sequência ARE na região promotora destes genes. ARE/EpRE, elemento de resposta antioxidante/eletrófilo; Nrf2, fator nuclear derivado de eritróide 2. Fonte: Adaptado de Masella et al., 2005.

Há evidências de que a regulação de genes mediada por Nrf2 é eficaz na proteção da hepatotoxicidade induzida pelo APAP. Gum e Cho, (2013), ao estudarem

essa relação, demonstraram que Nrf2 atua em diversos pontos alterados pela sobrecarga de APAP, como por exemplo, na síntese de GSH e na síntese de importantes enzimas como as de detoxificação de fase II e as enzimas capazes de inativar as espécies reativas formadas durante a metabolização deste fármaco. Partindo desse pressuposto, a capacidade dos flavonoides, presentes em muitos extratos de plantas, em ativar a transcrição de enzimas antioxidantes, através do fator de transcrição Nrf2, podem revelar importantes alternativas terapêuticas contra a toxicidade induzida pelo APAP.

Capítulo 3- Objetivos

3- OBJETIVOS

3.1 - *Objetivo Geral*

Investigar o efeito do extrato hidroalcoólico de *Baccharis trimera* (Carqueja) sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo oxidativo em neutrófilos e fígado de ratos intoxicados com paracetamol (APAP).

3.2 – *Objetivos Específicos 1 (Ensaio “in vitro”)*

Caracterizar o extrato hidroalcoólico de B. trimera em relação a sua:

- Composição química determinada por HPLC;
- Toxicidade em cultura de células hepáticas HEPG2;
- Capacidade antioxidante pelo ensaio do radical DPPH•.

3.3 – *Objetivos Específicos 2 (Ensaio “in vivo”)*

1ª Fase: Caracterizar o modelo de inflamação induzido por APAP em relação a:

- Atividade das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

2ª Fase: Avaliar em neutrófilos de ratos submetidos ou não ao tratamento com extrato de B. trimera e posteriormente intoxicados com APAP:

- A expressão gênica das subunidades (gp91^{phox}, p22^{phox} e p47^{phox}) da NADPH oxidase;
- A expressão gênica da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a concentração de nitrito;
- A expressão gênica e atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase;

3ª Fase: Avaliar em soro de ratos submetidos ou não ao tratamento com extrato de B. trimera e posteriormente intoxicados com paracetamol:

- Os marcadores bioquímicos de função hepática (Transaminases).

4ª Fase: Avaliar em fígado de ratos submetidos ou não ao tratamento com extrato de B. trimera e posteriormente intoxicados com paracetamol:

- Os marcadores de dano oxidativo (TBARS e proteína carbonilada);
- A expressão gênica das enzimas SOD, CAT, glutathione peroxidase e redutase;
- A atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase, glutathione peroxidase e redutase;
- A histopatologia hepática

Capítulo 4- Material e Métodos

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Reagentes

O APAP utilizado foi da Janssen-cilag farmacêutica. O azul de tripan, o DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), o trolox (6-hydroxy-1,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) e o ácido gálico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Os gradientes Leukopaque e Monopaque foram obtidos da Bion LTDA. O Kit para a medição dos níveis séricos de alanina aminotransferases (ALT) e aspartato aminotransferases (AST) foram adquiridos a partir da Labtest Diagnóstica, Brasil.

4.2 - Animais

Nos experimentos foram utilizados ratos albinos machos, da linhagem Fischer, com aproximadamente 12 semanas de idade e pesando cerca de 180 g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais dispostas em ambiente com temperatura, luminosidade e umidade controladas e receberam dieta comercial para rato (Labina) e água, ambos *ad libitum*. O presente trabalho foi realizado de acordo com as normas internacionais de proteção aos animais e com os princípios éticos do Conselho Nacional de Experimentação Animal, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP (OF 166/2011 protocolo 2011/82).

4.3 – Coleta do material botânico

As partes aéreas de *B. trimera* foram coletadas em agosto de 2011, na cidade de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. A espécie, de exsicata número OUPR 22127, foi identificada pela Professora Doutora Viviane R. Scalon e em seguida depositada no Herbário José Badini da UFOP.

4.4 – Preparação do extrato

Após identificação, as partes aéreas da planta foram lavadas em hipoclorito de sódio (1 a 2%), secas em estufa ventilada e, em seguida, pulverizadas em moinho mecânico e armazenadas em frascos de plástico. Na obtenção do extrato hidroalcoólico, cerca de 100 g da planta foram submetidas à extração com água

destilada e álcool 70% na proporção de 1:1 durante 24 h. Em seguida realizou-se a filtração a vácuo e a evaporação do solvente no rotavapor.

O extrato bruto formado, de coloração verde escuro e cheiro adocicado, foi diluído em solução salina (PBS 7,4) obtendo-se a concentração de 600 mg/kg que foi utilizada nos ensaios *in vivo*. A metodologia adotada para a confecção do extrato, com algumas modificações, foi baseada no trabalho de Grace et al., 2008.

4.5 – Ensaios “in vitro”

4.5.1 - Composição química do extrato determinada por HPLC

O extrato hidroalcoólico de *B. trimera* foi submetido a tratamento em cartuchos de extração em fase sólida (EFS) antes de serem analisados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD). O cartucho de EFS (3,0 mL), empacotado com sílica C-18, foi ambientado por duas vezes com MeOH/H₂O (9:1). Após esse procedimento, foram aplicados 20 mg da amostra e eluídas com 4,0 mL de MeOH/H₂O (9:1). Esse eluído foi seco e em seguida filtrado em filtros de seringa Chromafil® PDVF (difluoreto de polivinilideno) com volume suficiente para obter concentração de 10 mg/mL da amostra. Padrões dos flavonoides quercetina e rutina foram utilizados nas concentrações de 1mg/mL. Para a análise em CLAE-DAD foram injetados 20,0 µL da amostra e dos padrões.

O perfil cromatográfico das amostras foi determinado utilizando CLAE-DAD em coluna de fase reversa Luna (Phenomenex)® C-18 (5µm, 250 X 4,6 mm), eluída com gradiente linear de metanol (MeOH) e água [MeOH/H₂O 1:1 até MeOH 100% em 50 minutos, mais MeOH 100% por um período de 15 minutos] e fluxo de 0,8 mL/min, λ200-800 nm, a temperatura de 30°C. Para essas análises foi utilizado cromatógrafo Shimadzu LC 10AD acoplado com detector de arranjo de diodos (DAD).

4.5.2 - Viabilidade em cultura de células hepáticas HepG2

4.5.2.1 – Cultura de células

As linhagens de células hepáticas HepG2 foram adquiridas no banco celular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e cultivadas em fracos de crescimento de 75 cm² (SARDEST MEM) contendo meio de cultura HEPES

acrescido de 10% (v / v) de soro fetal bovino e 1% (v / v) de uma mistura de penicilina (200 U / mL) e estreptomicina (200 µg / mL).

Os frascos foram armazenados em estufa a 37°C e umidificados com 5% de dióxido de carbono (CO₂). Este meio foi substituído a cada dois ou três dias, dependendo da confluência da monocamada de células e as subculturas (passagens) realizadas. Quando os frascos atingiram 100% de confluência, o meio foi aspirado e a monocamada de células foi lavada duas vezes com solução salina tamponada com fosfato sem cálcio e sem magnésio (PBS). Nas monocamadas separadas, foi utilizada uma solução de 0,20% de tripsina e 0,02% de EDTA e em seguida, realizada a contagem de células com azul de tripan a 0,3% em câmara de Neubauer.

4.5.2.2 – Ensaio de viabilidade com MTT

As células HepG2 foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 1×10^5 células em cada poço em presença de meio DMEN e 10% de soro fetal bovino, perfazendo um volume final de 200µL. As placas contendo as células foram incubadas em uma câmara úmida com 5% de CO₂ a 37 °C durante 1 ou 24 horas na presença ou ausência de 0,5; 5 e 50 µg/mL do extrato de *B. trimera* para determinação da viabilidade celular. Estas concentrações foram baseadas em estudos anteriores do nosso laboratório (Pádua et al., 2010). Vale ressaltar que os resultados encontrados nas três diferentes concentrações foram similares quanto à relação viabilidade/toxicidade celular e por isto no item 5.1.2 será apresentado apenas os resultados de uma das concentrações, no caso 5 µg/mL. Após os tempos de incubação, o sobrenadante foi removido e adicionado 20 µL/poço de uma solução contendo 5,0 mg/mL de MTT em DMEN e incubadas por 4 h a 37 °C. A solução de MTT foi então removida e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço. A absorbância foi lida a 570 nm num leitor de microplacas (Thermo Plate). O cálculo utilizado para avaliar a porcentagem de viabilidade celular foi (absorbância das células tratadas / absorbância das células controle) x 100. À linhagem controle foram atribuídos 100% de viabilidade.

4.5.3 – Capacidade em sequestrar o radical DPPH•

A atividade do extrato de carqueja em sequestrar o radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foi medida de acordo com o procedimento descrito por Brand-Williams, (1995), com algumas modificações. Este método baseia-se na

transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) em solução de metanol. A habilidade da amostra em reduzir a absorbância do DPPH• é indicativa de sua capacidade em neutralizar radicais livres. Este é um dos métodos químicos mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante de um composto por ser considerado prático, rápido e estável (Espin et al., 2000).

Resumidamente, 100µL de diferentes concentrações do extrato (0,6; 1, 2; 2,5; 5,0 mg / mL) e do antioxidante padrão Trolox (0; 50; 75; 100; 125; 150; 175 e 200 mg / mL) foram adicionados a 3,9 mL de metanol 80% contendo o radical DPPH• (60mM). Essa mistura foi agitada vigorosamente e deixada em repouso no escuro em temperatura ambiente por 30 min. A redução dos radicais DPPH• foi medida por um leitor de ELISA a 515 nm. A atividade de sequestro do radical foi avaliada pela diminuição da absorbância do DPPH• e a porcentagem de inibição foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Atividade\% Limpeza} = (1 - A_{\text{Sample 515}} / A_{\text{Control515}}) \times 100$$

4.6 – Ensaios “in vivo”

4.6.1 - Avaliação da injúria hepática induzida por APAP

Para avaliar a injúria hepática induzida por APAP foram utilizados dez ratos, divididos em dois grupos de cinco animais de acordo com o tratamento recebido: grupo controle (C), o qual recebeu, por gavagem orogástrica, 600 mg/kg de PBS e o grupo APAP, que também, por gavagem, recebeu uma dose única de 835mg/kg de APAP. A dose de APAP usada teve como referência o trabalho de Yen, et al.,(2008). Em diferentes intervalos de tempo amostras de sangue foram coletadas, via plexo ocular, para a quantificação da atividade da ALT e AST em resposta a uma elevada dose de APAP.

4.6.2 – Delineamento Experimental

Para o experimento de inflamação induzida por APAP foram utilizados 32 ratos Fischer. Os animais foram distribuídos em quatro grupos de oito animais de acordo com o tratamento recebido: Grupo Controle, recebeu 1 mL de PBS; Grupo Carqueja (Bt), recebeu uma dose de 600mg/kg do extrato de *B. trimera*; Grupo Paracetamol (APAP), recebeu uma dose única de 835mg/kg de Paracetamol; Grupo

Carqueja + Paracetamol (Bt + APAP), recebeu 600mg/kg do extrato de *B. trimera* e 1 hora depois uma dose única de 835mg/kg de paracetamol. A solução salina, o extrato de *B. trimera* e o APAP, foram administrados através de gavagem orogástrica. Vinte quatro horas após a intoxicação com APAP os ratos foram eutanasiados sendo o sangue e o fígado coletados para análises, conforme

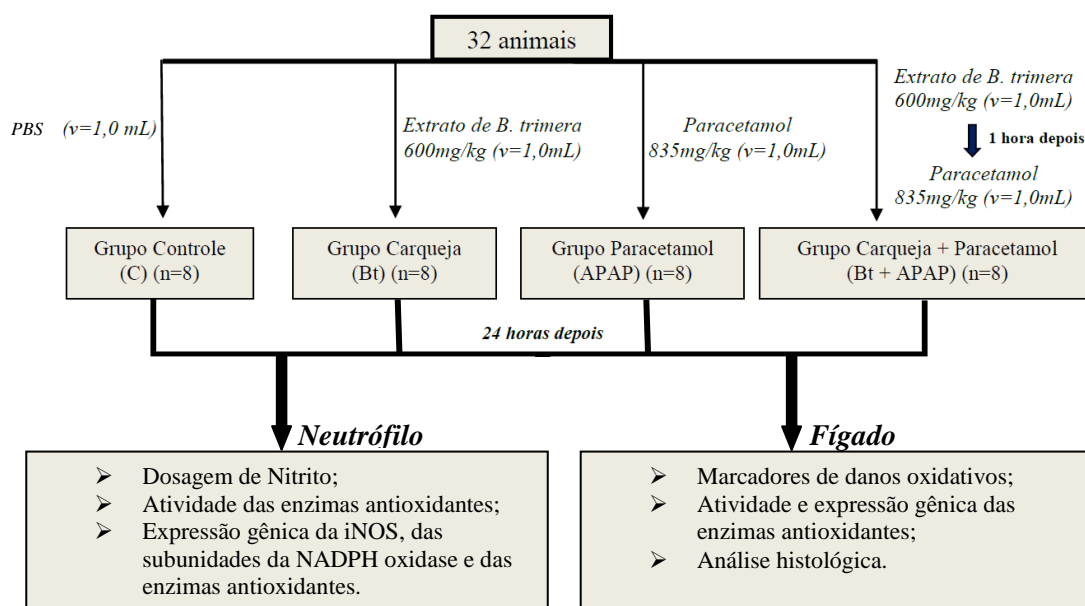


Figura 9 – Delineamento experimental

* A concentração de carqueja foi obtida a partir de resultados prévios do laboratório, conforme publicado por Pádua et al., 2010.

4.6.3 – Isolamento de leucócitos polimorfonucleares

Os neutrófilos foram obtidos a partir do sangue periférico por hemorragia da região do plexo braquial segundo a técnica descrita por Bicalho et al., (1981). Resumidamente, 4 mL de sangue periférico heparinizado, foram adicionados sobre 6 mL de gradiente duplo de Leukopaque e Monopaque (densidade = 1,08 e 1,12, respectivamente) em tubos siliconizados. Após centrifugação a 1000g por 20 minutos foram obtidas duas fases distintas separadas por dois anéis interfásicos, sendo o anel superior formado por células mononucleares e o inferior por neutrófilos. O anel rico em neutrófilos foi colocado em tubo siliconizado, com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, esse anel foi lavado duas vezes em PBS pH 7,35. Após as duas lavagens as células foram ressuspensas em 1,0 mL de PBS pH 7,35. Os neutrófilos foram usados para a dosagem de nitrito, atividade de catalase e superóxido dismutase e extração de mRNA. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão com azul de Tripán.

4.6.4 – Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade dos neutrófilos utilizados nos ensaios foi monitorada pelo teste de exclusão com azul de tripan (Oliveira-Lima e Dias da Silva, 1970). Após o isolamento dos neutrófilos, 1×10^6 células foram centrifugadas a 1000g por 15 minutos, e o *pellet* ressuspenso em 200 μ L de PBS pH 7,35, ao qual foi adicionado 1 gota de solução 0,1% de azul de tripan. Em todos os ensaios monitorados a viabilidade celular nunca se mostrou inferior a 95%.

4.6.5 – Dosagem de óxido nítrico

A concentração de NO foi determinada usando o kit BioAssay System (DINO – 250). Sabe-se que em soluções aeróbicas aquosas, o nitrito é o principal metabólito estável da decomposição do óxido nítrico. Sendo assim, o kit mensura a produção de NO pela redução de nitrato a nitrito utilizando o método de *Griess* adaptado.

Resumidamente, neutrófilos (1×10^6 /mL) foram homogeneizados com PBS pH 7,35 e centrifugados a 10000g, por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado na dosagem.

Para a reação de desproteinação, 100 μ L da amostra biológica foram adicionados a 80 μ L de sulfato de zinco (75 mM) e centrifugados a 10000g durante 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 120 μ L de NaOH (55 mM), e novamente centrifugado a 10000g durante 5 minutos à 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi misturado a 70 μ L de tampão glicina. Após a reação de desproteinação, as amostras foram utilizadas no teste.

Para a reação de redução do nitrato, foram adicionados 3 grânulos de cádmio ativados e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. A confecção da curva padrão e as dosagens foram realizadas em placas de ELISA. Em cada poço foi adicionado 50 μ L de reagente A, 50 μ L de reagente B e 100 μ L de amostra ou padrão. A placa foi incubada 5 minutos a temperatura ambiente e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm.

4.6.6 – Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase total foi determinada utilizando o “*Superoxide Dismutase assay Kit* (Chemical Cayman, MI, EUA). Resumidamente, neutrófilos (1×10^6 /mL) foram homogeneizados em tampão HEPES 20 mM, gelado,

pH 7,2, contendo 1mM de EGTA, 210 mM de sacarose e 70 mM de manitol. Para a realização do ensaio foi utilizado 10 µL de sobrenadante. A reação iniciou-se pela adição da xantina oxidase. A placa foi incubada em um agitador a temperatura ambiente por 20 minutos e a absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808).

4.6.7 – Atividade da catalase

A CAT é uma enzima antioxidante que catalisa a decomposição do H₂O₂ em água e oxigênio. A atividade da CAT foi determinada usando o —*EnzyChrom™ Catalase Assay Kit* (BioAssay System, CA, USA). Resumidamente, neutrófilos (1×10⁶/mL) foram homogeneizados em 200 µL de tampão fosfato pH 7,4. A reação iniciou-se com a adição de 50 mM H₂O₂ por reação durante 30 min. Depois dessa incubação foram acrescentados 100 µL de reagente de detecção por reação, a placa foi agitada e incubada por 10 min. A absorbância foi medida em 570 nm usando um leitor de placa de ELISA (BiotekELx808). Para a realização do cálculo foi feito a seguinte normatização: uma unidade é a quantidade de CAT que decompõe um µmol de H₂O₂ por min em pH 7,0 e temperatura ambiente.

4.6.8 - Preparação do tecido hepático

A coleta do tecido hepático foi realizada imediatamente após a eutanásia dos animais. Para determinar concentrações de proteína carbonilada, 200 mg de tecido foi homogeneizado em 50 mM de tampão de fosfato (pH 6,7) e EDTA 1 mM. Para determinar a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a atividade da CAT e SOD, 100 mg de tecido de fígado foi homogeneizado em tampão de fosfato (pH 7,4). Do mesmo modo, para determinar a concentração total de glutathione, 100 mg de tecido de fígado foi homogeneizado em 5% de tampão sulfossalicílico. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10000 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e utilizado como a amostra biológica.

4.6.9 - Análise dos marcadores do estresse oxidativo em tecido hepático

4.6.9.1 - Proteína Carbonilada

Proteína carbonilada é um marcador da oxidação de proteína por EROs. Derivados carbonílicos podem ser mensurados por métodos sensitivos, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Este método reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente (Levine et al., 1994).

Para realização da dosagem, amostra de 400 mg de tecido hepático foi homogeneizada em 2 mL de tampão fosfato 50 mM, (pH 6,7) e em seguida o homogenato foi centrifugado a 10000g por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado no procedimento experimental. O volume de 500 µL do sobrenadante do homogenato foi transferido para dois tubos de polipropileno denominados, Amostra (A) e Controle (C). A cada tubo foi adicionado igual volume de ácido tricloroacético (TCA) 10% e após centrifugação a 5000g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados ao tubo A 500 µL de DNPH 10 mM em 2 M de ácido clorídrico (HCl), e ao tubo C 500 µL de HCL 2 M. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos sofrendo agitação a cada 15 minutos. No passo seguinte foram adicionados 500 µL de TCA 10% em cada tubo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 5000 g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram novamente descartados. Os precipitados em ambos os tubos foram lavados com 1 mL da mistura etanol/acetato de etila, na proporção de 1:1, misturados no vórtex e novamente centrifugados conforme descrito na etapa anterior, o sobrenadante foi descartado. Este último passo foi repetido duas vezes. Ao final do processo de lavagem, foram adicionados em ambos os tubos 1 mL de SDS 6%, misturados no vórtex e centrifugados à 10000 g por 10 minutos à 4°C. Finalmente as absorbâncias dos sobrenadantes foram determinadas a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol de proteína carbonilada por mg de proteína.

O conteúdo de DNPH incorporado foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar do DNPH ($22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) segundo a lei de Lambert Beer.

$$A=C.b.\epsilon$$

Onde A é a subtração da absorbância do tubo A (amostra) pela absorbância do tubo C (controle), C é a concentração, b é o caminho óptico e ϵ é o coeficiente de extinção molar.

4.6.9.2 - Níveis de TBARS

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico utilizando o método de Buege e Aust (1978). A determinação da concentração de TBARS se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados.

Para realizar a dosagem, 100 mg do tecido hepático foram homogeneizados com 1 mL de tampão Tris HCl 20 mM (pH 7,4) e em seguida o homogenato foi centrifugado a 10000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica.

Em um tubo foi adicionado o volume de 500µL de homogenato, 250µL de ácido TCA a 28% dissolvido em HCl a 0,25N, 250µL de TBA a 1% dissolvido em ácido acético 1:1, e 125µL de butil-hidroxi-tolueno (BHT) 5mM dissolvido em etanol. Este tubo foi agitado no vórtex e colocado em um banho maria a 95°C por 15 minutos. Após este tempo, os tubos foram imediatamente colocados em um banho de gelo, em seguida agitados e levados à centrifugação a 10000g por 15 minutos a 4°C. A absorbância do sobrenadante obtido foi determinada a 535 nm em espectrofotômetro zerado com água destilada (branco).

A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, segundo a lei de Lambert Beer. Usualmente essa concentração é representada em nmol/mL.

4.6.10 - Análise das defesas antioxidantes em tecido hepático

4.6.10.1 - Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD total foi determinada utilizando o “Superoxide Dismutase assay Kit” (Chemical Cayman, MI, EUA). Resumidamente, 100 mg de tecido hepático foram homogeneizados em 1 ml de tampão HEPES 20 mM, gelado, pH 7,2, contendo 1mM de EGTA, 210 mM de sacarose e 70 mM de manitol. O homogenato foi centrifugado a 12000 g por 10 minutos em centrifuga refrigerada a 4°C, e o sobrenadante foi retirado para ser utilizado como amostra biológica.

Para a realização do ensaio foi utilizado 10 µL de sobrenadante. A reação iniciou-se pela adição da xantina oxidase. A placa foi incubada em um agitador a temperatura ambiente por 20 minutos e a absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808).

4.6.10.2 - Atividade da Catalase

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade de clivar o H₂O₂ em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi (1984).

Resumidamente, um fragmento de 100 mg de tecido hepático foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato 100mM, (pH 7,2) e em seguida centrifugado a 10000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno foram adicionados 50 µL de tampão fosfato 100 mM, (pH 7,2) e 40 µL de água destilada e 10 µL da amostra. A reação foi iniciada pela adição de 900 µL de H₂O₂ (5 mM). As absorbâncias foram determinadas a cada minuto, durante três minutos, a 240 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

Uma unidade (U) de catalase é equivalente à hidrólise de 1mol de H₂O₂ ($\epsilon = 39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto (AEBI, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada em µmol/mL de amostra. A atividade da catalase foi calculada segundo a lei de Lambert Beer. A absorbância utilizada para o cálculo é o delta obtido das três absorbâncias lidas (absorbância final – absorbância inicial).

4.6.10.3 - Glutathiona total, oxidada e reduzida

A glutathiona está presente nas células principalmente na sua forma reduzida (GSH) representando em torno de 90%, o restante aparece na forma oxidada (GSSG). Esta dosagem foi adaptada do kit comercial Sigma #CS0260, e utiliza um método cinético para mensurar os níveis de glutathiona total (GSH+GSSG) em amostras biológicas, através da redução do DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) à TNB.

Para realizar a dosagem, amostra de 100mg de tecido hepático foi homogeneizada com 1mL de ácido de sulfosalicílico 5% (SSA), e em seguida centrifugado a 10000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

A dosagem foi realizada em microplaca de 96 poços. Inicialmente foram adicionados aos poços 150 µL da mistura de trabalho que contém GR, DTNB, e 100 mM tampão fosfato de potássio. Em seguida adicionou-se 10 µL de amostra para os testes e 10 µL de 100 mM tampão fosfato de potássio para o branco. As amostras foram incubadas por 5 minutos e em seguida a reação foi iniciada com a adição de 50 µL de

solução de NADPH. Com o início da reação, a absorbância foi imediatamente medida a 405 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Foram realizadas 6 leituras com intervalo de 1 minuto entre cada leitura.

Para mensurar os níveis de GSSG, o procedimento foi o mesmo, porém a amostra biológica passa por um processo de derivatização antes do início da dosagem. Para isso foi feito uma alíquota de 100 µL de amostra onde foi acrescentado 2 µL de vinilpiridina e 3 µL de TEA. Esta nova amostra tinha o pH entre 6 e 7 e ficou incubada por uma hora. Após este período, utilizou-se 10 µL desta nova amostra para reagir com a mistura de trabalho, como anteriormente descrito.

As concentrações de glutathiona total e oxidada foram obtidas através de uma curva padrão realizada para cada uma das dosagens. A subtração da concentração de glutathiona oxidada do valor da concentração da glutathiona total forneceu o valor da concentração da glutathiona reduzida.

4.6.10.4 - Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi mensurada utilizando o “Glutathione Peroxidase Activity Kit” (Assay Designs Inc., catalog #900-158, Michigan, EUA) adaptado. O ensaio é baseado na oxidação da glutathiona reduzida a oxidada catalisada pela enzima glutathiona peroxidase. A glutathiona oxidada por sua vez é reciclada e convertida de volta a glutathiona reduzida pela enzima glutathiona redutase utilizando NADPH. O decréscimo na absorbância medida a 340nm durante a oxidação do NADPH a NADP^+ é indicativo da atividade de glutathiona peroxidase.

Para realizar a dosagem, uma amostra de 40mg de tecido hepático foi homogeneizado em 200 µL de tampão de ensaio proveniente do kit contendo 0,4 mM do inibidor de protease PMSF e 1% de Triton x-100. O homogenato foi centrifugado a 1.000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para ser utilizado como amostra.

A dosagem foi realizada em microplaca de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 200µL do tampão de ensaio contido no kit com pH 7,0, 20 µL do mix de reação (contendo glutathiona reduzida, NADPH, glutathiona redutase e azida sódica), e 20 µL de amostra para os testes, padrão de glutathiona peroxidase para o controle positivo, e tampão de ensaio para o branco. A reação foi iniciada ao serem adicionados 20 µL de H_2O_2 a todos os poços. A absorbância foi imediatamente medida a 340 nm utilizando

um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Foram realizadas 6 leituras com intervalo de 10 segundos entre cada leitura.

Para cálculo da atividade de glutathione peroxidase foi considerada a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade em mmol/min/ml ou U/ml} = \frac{\Delta A_{340} \times DF}{6,22 \times V}$$

Onde:

Abs 340nm/minuto = Abs inicial – Abs final

$\Delta A_{340} = \Delta A_{340}/\text{min}(\text{branco}) - \Delta A_{340}/\text{min}(\text{teste})$

6,22 = ϵ mM do NADPH

DF = fator de diluição da amostra antes de adicionar à reação

V = volume da amostra em ml

4.6.10.5 - Atividade da Glutathione Redutase (GR)

A atividade da enzima glutathione redutase foi determinada utilizando o “Glutathione Reductase Assay kit” (Sigma, Missouri, EUA). O ensaio é baseado na redução da glutathione pelo NADPH em presença de glutathione redutase.

Uma amostra de 50mg de tecido hepático foi homogeneizada com 500 μ L de tampão proveniente do kit (10 mM fosfato de potássio pH 7,5, 1 mM EDTA e 1mg/ml de albumina bovina sérica). O homogenato foi centrifugado a 1.000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para ser utilizado como amostra.

O ensaio colorimétrico foi adaptado para ser realizado em microplaca de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 125 μ L de 2 mM glutathione oxidada, 40 μ L de tampão de ensaio proveniente do kit, 10 μ L de amostra para os testes, padrão de glutathione redutase para o controle positivo, e tampão de ensaio para o branco. Em seguida foram adicionados 62,5 μ L de 3 mM DTNB e a reação foi iniciada ao adicionar 12,5 μ L de 2 mM NADPH em todos os poços. A absorbância foi imediatamente medida a 412 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Foram realizadas 11 leituras com intervalo de 10 segundos entre cada leitura.

Para o cálculo da atividade de glutathione redutase na amostra foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade da GR em Unidades/ml} = \frac{(\Delta A_{\text{amostra}} - \Delta A_{\text{branco}}) \times (\text{fator de diluição})}{\epsilon^{\text{mM}} \times \text{volume da amostra em ml}}$$

Onde, ϵ do DTNB = $14,15 \text{mm}^{-1} \text{cm}^{-1}$

4.6.11 - Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de Lowry et al. (1951). O princípio do método baseia-se na redução do reagente de Folin Ciocalteu, ao reagir com aminoácidos aromáticos, catalisada por íons cobre, em meio alcalino, formando uma coloração azul.

Inicialmente foram preparadas as soluções de trabalho conforme descrito abaixo:

- Reagente A: dissolve-se 0,25g de sulfato de cobre e 0,5 de citrato de sódio em 100 mL de água destilada. A solução deve ser armazenada, no escuro, em temperatura ambiente.

- Reagente B: dissolve-se 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250 mL de água destilada. Deve ser armazenada a temperatura ambiente.

- Reagente C: adiciona-se 1 mL do reagente A em 50mL do reagente B. Deve ser preparado na hora do teste.

- Reagente D: dissolve-se 1 mL de Folin-Ciocalteu em 1mL de água destilada. Deve ser preparado na hora do teste.

Em seguida foram realizados quatro pontos para a construção da curva padrão para proteínas totais, pelo seguinte procedimento:

P1- 25 μ L de uma solução estoque de proteínas a 0,2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,05mg/mL.

P2- 7,5 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,15mg/mL.

P3- 15 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,30mg/mL.

P4- 25µL de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,5mg/mL.

Para a realização da dosagem, foram adicionados 10 µL de amostra ou padrão em tubos de polipropileno e completados para 100 µL com água destilada. O branco, usado para zerar o espectrofotômetro, foi feito apenas com 100 µL de água destilada. Posteriormente adicionou-se 1 mL do reagente C em todos os tubos (incluindo branco e padrões). A mistura foi agitada no vórtex e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foi adicionado em cada tubo 100 µL do reagente D. O volume foi misturado e incubado a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 660nm.

Após as leituras, foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão (Eixo Y) versus absorvância do padrão (Eixo X). A equação da reta gerada foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais nos homogenatos de tecidos. Todas as concentrações foram obtidas em mg/mL.

4.6.12 – Ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real

4.6.12.1 - Extração do RNA total de neutrófilos

O RNA total foi extraído de neutrófilos (4×10^6) usando Trizol (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, as amostras foram transferidas para tubos de polipropileno e foram adicionados 500 µL de trizol às amostras lentamente. Estas foram deixadas no gelo por 10 minutos para completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Foram adicionados 100 µL de clorofórmio em cada tubo, misturou-se por 10 minutos e incubou-se no gelo por mais 10 minutos. Na sequência, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12000g a 4°C. Após a centrifugação, foi removida a fase aquosa (contendo o RNA). Esta fase foi transferida para outro tubo, sendo adicionados 250µL de isopropanol. A solução foi homogeneizada e incubada por 45 minutos a -20°C. Em seguida, foi centrifugada por 15 minutos a 12000g a 4°C e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1 mL de etanol 75%, misturado por inversão e centrifugado por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco em temperatura ambiente. O RNA foi ressuspensionado em 30 µL de água DEPEC (dietilpirocarbonato). Por último, foi determinada a concentração e pureza do RNA, em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, UK).

4.6.12.2 - Extração do RNA total de células hepáticas

O RNA total do tecido hepático de ratos foi isolado utilizando o sistema RNAgents Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 50 mg do tecido hepático foram homogeneizados com 292 μL de tampão de lise. Do homogenato obtido coletou-se 175 μL que foram adicionados ao volume de 350 μL do “RNA dilution buffer”. Essa solução foi incubada a 70°C por exatamente 3 minutos. Após este período, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo autoclavado onde adicionou-se 200 μL de etanol 95%. Essa mistura foi transferida para o “Spin Basket Assembly”, centrifugada por 1 minuto a 12000 rpm, e após a centrifugação, descartou-se o eluente. Adicionou-se 600 μL de “RNA Wash solution” (RWA) e os tubos foram centrifugados novamente por 1 minuto a 12000 rpm. O eluente foi novamente descartado. Adicionou-se 50 μL de mix de incubação de DNase nas membranas dos tubos que foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 μL de “DNase Stop Solution” e os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 12000 rpm. Em seguida foram realizados dois ciclos de lavagem seguidos de centrifugação. Após estas etapas, o “spin basket” foi transferido para um tubo comum. Adicionou-se 100 μL de “Nuclease Free Water” na membrana, e o tubo foi centrifugado duas vezes por 1 minuto a 12000 rpm. A concentração e pureza do RNA total contido no eluente obtido foi verificada a 260 e 280 nm no espectrofotômetro Nano Vue da GE Healthcare (Reino Unido).

4.6.12.3 - Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μg de RNA total, utilizando oligo (dT) (Applied Biosystems, Foster City, CA) e o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O meio de reação continha 2 μL de tampão 10x (500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl, 25 mM de MgCl₂, pH 8,3), 0,8 μL da mistura de desoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) 100 mM, 1 μL de oligo (dT), 1 μL da enzima transcriptase reversa MultiScribe (50 U/ μL). A reação foi realizada nas seguintes condições: 10 minutos a 25°C, seguido de 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C em termociclador Biocycler modelo MJ96+.

4.6.12.4 – Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Em neutrófilos, os iniciadores utilizados para amplificar o gene de referência endógena, $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$), e os genes das subunidades $p22^{phox}$ e $p47^{phox}$ da NADPH oxidase, foram construídos de acordo com Vinolo et al., (2009). Os iniciadores usados para amplificar os genes da subunidade $gp91^{phox}$ da NADPH oxidase e da iNOS foram desenhados com base nas sequências de *Rattus norvegicus*, disponíveis no banco de dados do GenBank (National Center for Biotechnology Information, número de acesso AF298656 e NM012611, respectivamente). As construções foram feitas com o auxílio do programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os iniciadores utilizados para amplificar os genes da Zn-SOD e catalase foram construídos de acordo com Xiong et al., (2010), assim como os oligos utilizados para a amplificação dos transcritos das enzimas hepáticas Catalase, Glutathione Peroxidase, Zn-SOD e Mn-SOD e 18S.

5.6.12.5 – Curva de eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores

Para determinar a eficiência da amplificação dos genes alvo e do gene de referência endógena foram construídas curvas padrões para cada amplificado, a partir de diluições seriadas do cDNA de uma mesma amostra. A análise de regressão linear dos valores de *—Threshold Cycle* (CT) em função do logaritmo da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta (a, em $y = ax+b$) que foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos iniciadores.

4.6.12.6 – RT-PCR quantitativa em tempo real

Para a análise da expressão dos genes em estudo foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (qPCR). A quantificação dos produtos formados durante os ciclos de amplificação foi realizada com o reagente *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, sendo adicionados em cada poço 2 μ L de cDNA (100 ng), 0,48 μ L de cada primer (forward e reverse, 10 μ M), 6 μ L *Power de SYBR® Green Master Mix* e volume final de água livre de DNase para 12 μ L. As reações foram realizadas nas seguintes condições, 50°C por 2min, 95° C por 10 min e então 40 ciclos de 95°C por 15s (desnaturação) e 60°C por 1min (anelamento dos iniciadores e extensão dos produtos) no termociclador ABI 7300 (Applied Biosystems, CA, USA). O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foram realizados pelo

programa 7000 System SDS Software (Applied Biosystems). Todas as análises foram realizadas em triplicata técnica. A especificidade dos produtos obtidos foi confirmada pela análise das curvas de dissociação do produto amplificado ao final de cada reação.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica (CT comparativo ou $\Delta\Delta CT$), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as diferentes amostras. A expressão dos genes alvo foi determinada em função da expressão do gene de referência endógena $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) e uma amostra normalizadora (grupo C) foi utilizada como base para os resultados de expressão comparativa. De posse dos valores de CT, que corresponde ao número de ciclos na fase exponencial da PCR em que a fluorescência ultrapassa o valor basal, foi calculado o ΔCT de cada amostra, na qual o valor do CT do gene de referência endógena ($\beta 2M$) foi subtraído do CT do gene alvo.

$$\Delta CT = CT \text{ do gene alvo} - CT \text{ do gene de referência endógena}$$

Em seguida foram calculados os valores de $\Delta\Delta CT$, na qual o valor do ΔCT da amostra normalizadora (grupo C) foi subtraído do ΔCT das amostras teste (demais grupos experimentais).

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ da amostra teste} - \Delta CT \text{ da amostra normalizadora}$$

Os valores do $\Delta\Delta CT$ obtidos foram utilizados em uma fórmula aritmética para o cálculo final da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, dada por $2^{\Delta\Delta CT}$.

5.6.13 – Avaliação Histológica

Fragmentos de fígado não superior a 4 mm de diâmetro foram fixados em solução de formol a 10% e, em seguida, desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. As secções de parafina de aproximadamente 4 mm foram obtidas por corte de fragmentos embutidos num micrótomato rotativo. As secções foram montadas em lâminas de vidro limpas e desengorduradas. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina para visualização de dano histológico. Para determinar o número médio de células inflamatórias, análises morfométricas digitais foram realizadas utilizando um microscópio óptico Leica, sendo as analyses feitas com o software Leica Qwin DM5000 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA). O número médio de células beta e alfa foi determinada utilizando o software ImageJ (NIH, EUA). Todas as amostras histológicas dos animais controle e tratamento foram submetidos à análise cega.

4.7– Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (SD). Todos os dados foram submetidos a um teste de normalidade . Depois de determinar que os dados seguiam uma distribuição normal, optou-se por utilizar o teste t de Student. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Os testes foram realizados utilizando o GraphPad Prism Versão 4.00 para Windows (San Diego, CA, EUA).

Capítulo 5- Resultados

5- RESULTADOS

5.1 – Ensaios *in vitro*: Caracterização do extrato hidroalcoólico de *B. trimera*.

5.1.1 - HPLC-DAD (cromatografia líquida de alta precisão - Diode Array).

No cromatograma abaixo (**Figura 10A**), observamos uma elevada concentração de picos nos primeiros 6 minutos de análise, o que corresponde a grupos de substâncias com características de alta polaridade. Quando extraímos espectros de ultravioleta observamos que o pico em 3,13 minutos apresentou 3 bandas de absorção com λ_{\max} em 263 e 324 nm (**Figura 10B**). O pico em 4,36 e 4,63 minutos, apresentou λ_{\max} de absorção em 272 e 231nm e 273 e 331 nm, respectivamente (**Figuras 10C e 10D**). Com o gradiente crescente em MeOH e a fase estacionária de fase reversa, não observamos eluição de substâncias com graus decrescentes de polaridade. Neste sentido, foi possível observar dois picos bastante proeminentes em 11,84 e 22,60 minutos. O primeiro apresentou bandas de absorção com λ_{\max} em 300 e 324 nm (**Figura 10E**), enquanto que o pico em 22,60 minutos apresentou 4 bandas de absorção com λ_{\max} em 273 e 343 nm (**Figura 10F**).

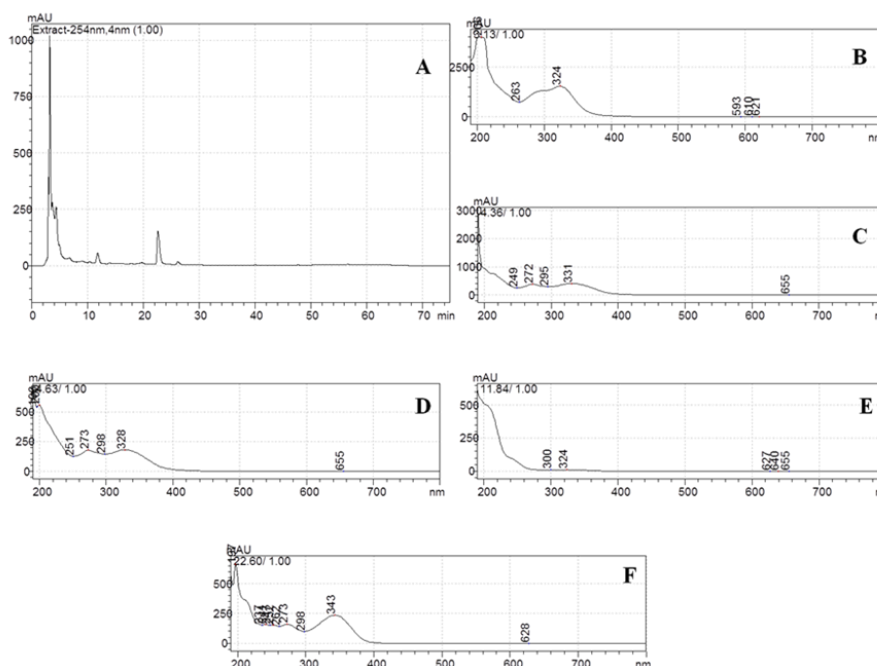


Figura 10 – (A) Cromatografia de amostras de *B. trimera* preparadas para administração em animais experimentais; (B) Espectro UV de picos eluídos em 3.13 minutos; (C) Espectro UV de picos eluídos em minutos 4.36; (D) Espectro UV de picos eluídos em 4.63 minutos (E) Espectro UV de picos eluídos em 11.84 minutos; (F) Espectro UV de picos eluídos em 22.60 minutos.

Os padrões utilizados de quercetina e rutina apresentaram tempos de retenção de 13,95 e 6,52 minutos. Estes compostos, rutina e quercetina, apresentam padrões de oxidação nos carbonos 3', 4', 5 and 7 do anel A e C, e no carbono 3 do anel B (quercetina). Contudo, na rutina, este grupo hidroxila no carbono 3 (anel B) é substituído por um dissacarídeo (raminose + glicose). Diante disso, podemos associar a banda de absorção em 370 nm ao anel B da quercetina (**Figuras 11A e 11B**) e em 356 nm ao anel B da rutina (**Figuras 11C e 11D**). Com relação ao anel A podemos observar bandas com absorção máxima em 254 e 256 nm.

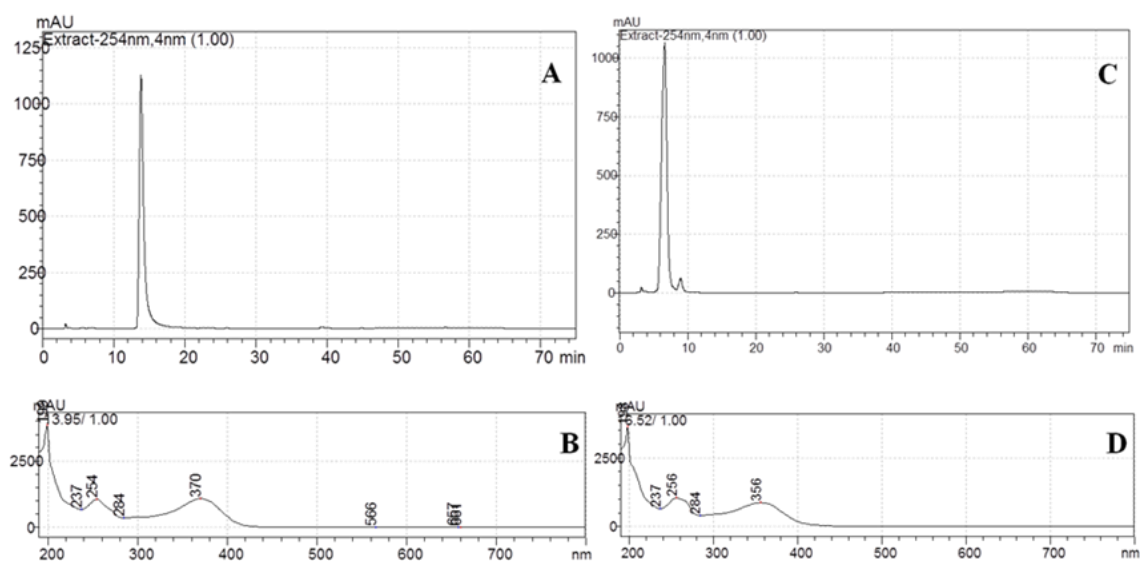


Figura 11 – (A e B) Cromatografia HPLC-DAD, monitorado em 254 nm e espectro de absorção de UV da quercetina; (C e D) Cromatografia HPLC-DAD, monitorado em 254 nm e espectro de absorção de UV da rutina.

5.1.2 – Avaliação da toxicidade do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* em células de linhagem hepática (HepG2).

Para avaliar a viabilidade e toxicidade do extrato de *B. trimera*, células hepáticas foram incubadas na presença ou ausência do extrato (**Tabela II**). Após incubação de 1 e 24 horas foi observado que as células incubadas com o extrato mantiveram uma viabilidade de 89.0% e 98.6%, respectivamente. Além disso, o extrato não apresentou uma toxicidade significativa (11.0% e 1.4%) em 1 e 24 horas, respectivamente.

Linhagem	1 hora		24 horas	
	Viabilidade	Toxicidade	Viabilidade	Toxicidade
HEP G2	100%	0%	100%	0%
HEP G2+Bt	89.0%	11.0%	98.6%	1.4%

Tabela II – Representa a viabilidade e toxicidade do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* em células hepáticas (HepG2). Os dados estão expressos em porcentagem. A linhagem de células HepG2 foi incubada na ausência de *B. trimera*, enquanto que a linhagem HepG2+Bt corresponde a cultura de células incubadas com 5µg/mL de extrato de *B. trimera*.

5.1.3 - Avaliação da capacidade do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* em neutralizar o radical DPPH•

A capacidade antioxidante do extrato de *B. trimera* e do antioxidante de referência Trolox foram determinadas e expressas em percentual de inibição do radical DPPH• (**Tabela III**).

As quatro diferentes concentrações do extrato de *B. trimera* foram eficientes em neutralizar o radical DPPH•, o que de certa forma, é um indicativo da sua possível capacidade em neutralizar espécies reativas. Todas as concentrações testadas apresentaram uma capacidade de neutralização similar a do Trolox nas concentrações entre 50 e 200 mg/L.

Tabela III - Percentual de inibição do radical DPPH• por diferentes concentrações do extrato de *B. trimera* e do antioxidante de referência Trolox em 30 e 60 minutos.

Composto	Concentração
Capacidade de neutralização do radical DPPH	
<i>B. trimera</i> (mg/L)	
	30 min
0,6	15,85 ± 1,22
1,2	35,98 ± 2,54
2,5	68,13 ± 1,46
5,0	88,48 ± 0,52
<i>B. trimera</i> (mg/L)	
	1 h
0,6	24,06 ± 0,59
1,2	49,52 ± 2,30
2,5	87,46 ± 0,54
5,0	90,39 ± 0,58
Trolox (mg/L)	
50,0	19,57 ± 0,44
75,0	29,43 ± 0,11
100,0	38,04 ± 0,22
125,0	45,42 ± 0,55
150,0	55,36 ± 0,94
172,0	69,10 ± 1,09
200,0	78,34 ± 1,21

Os dados estão expressos como média e desvio padrão de determinações em triplicata.

5.2 – Ensaios *in vivo*: Caracterização do modelo de inflamação induzido por APAP

5.2.1 – Atividade da ALT e AST

Para a caracterização do modelo de inflamação no ensaio *in vivo*, realizamos previamente uma curva onde analisamos, em diferentes períodos de tempo, a atividade da ALT e AST após a administração de APAP. Conforme pode ser observado na **Figura 12**, os animais do grupo controle (C) que receberam PBS apresentaram baixa atividade de ALT e AST. Em contraste, os animais que receberam um tratamento oral de 835 mg/kg de APAP demonstraram uma maior atividade desta enzima, atingindo o seu pico máximo vinte quatro horas após a administração do APAP. Quarenta e oito horas após a dose de APAP a atividade de ALT e AST começou a diminuir chegando, no tempo de setenta e duas horas, a valores significativamente menores que os encontrados no tempo de vinte quatro horas.

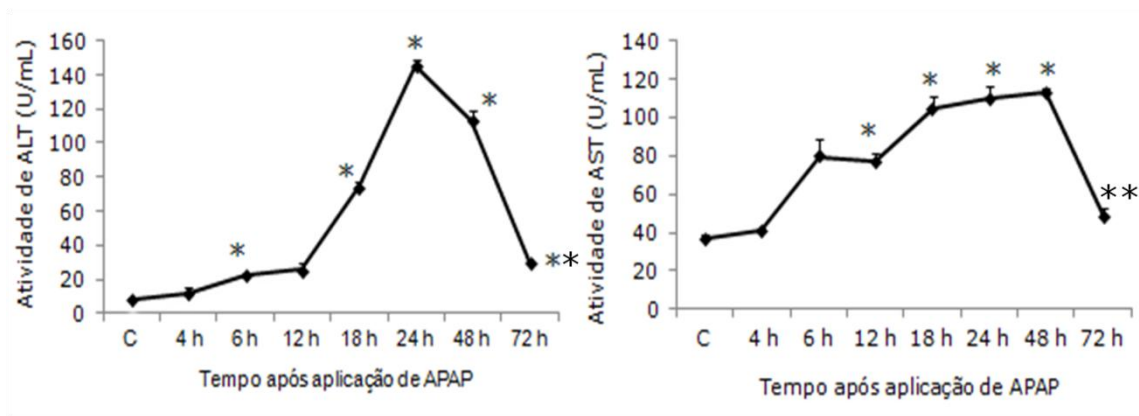


Figura 12 - Hepatotoxicidade do APAP em ratos Fischer. A atividade sérica de ALT e AST foram medidas nos tempos indicados após uma dose única de APAP (835 mg/kg). Os dados estão representados como média + desvio padrão (n=5). *p < 0,05 em relação ao controle; **p < 0,05 em relação ao valor encontrado no tempo de 24 horas.

5.3 - Efeito do extrato de *B. trimera* no metabolismo redox de neutrófilos do sangue periférico de ratos intoxicados com APAP.

5.3.1 – Efeito do extrato de *B. trimera* sobre a expressão gênica das subunidades da NADPH oxidase.

Recentemente nosso grupo demonstrou que os neutrófilos periféricos de ratos intoxicados com APAP apresentavam uma maior produção de ERO (1768 ± 447 RLU/min) quando comparado aos neutrófilos de ratos controles (329 ± 283 RLU/min). Além disso, demonstramos também que neutrófilos de ratos pré-tratados com extrato de *B. trimera* e uma hora depois intoxicados com APAP apresentaram uma redução na produção de ERO (917 ± 344 RLU) quando comparado aos neutrófilos de ratos que receberam somente APAP.

Como a NADPH oxidase é a principal enzima responsável pela produção de ERO em neutrófilos, analisamos, como mostrado na **Figura 13**, a expressão gênica das subunidades membranares (gp91^{phox}, p22^{phox}) e citosólica (p47^{phox}) desta enzima. Os neutrófilos de ratos tratados com APAP apresentaram uma maior expressão das subunidades gp91^{phox}, p22^{phox} e p47^{phox} quando comprado aos neutrófilos de ratos controles. Em contrapartida, nos neutrófilos de ratos que receberam o extrato de *B. trimera* e uma hora depois APAP, os níveis de mRNA correspondente as subunidades gp91^{phox} e p47^{phox} foram significativamente menores em relação ao do grupo APAP. Os neutrófilos de ratos que receberam somente o extrato de *B. trimera* não apresentaram

níveis de mRNA das subunidades gp91^{phox}, p22^{phox} e p47^{phox} diferentes à aqueles encontrados para o grupo controle.

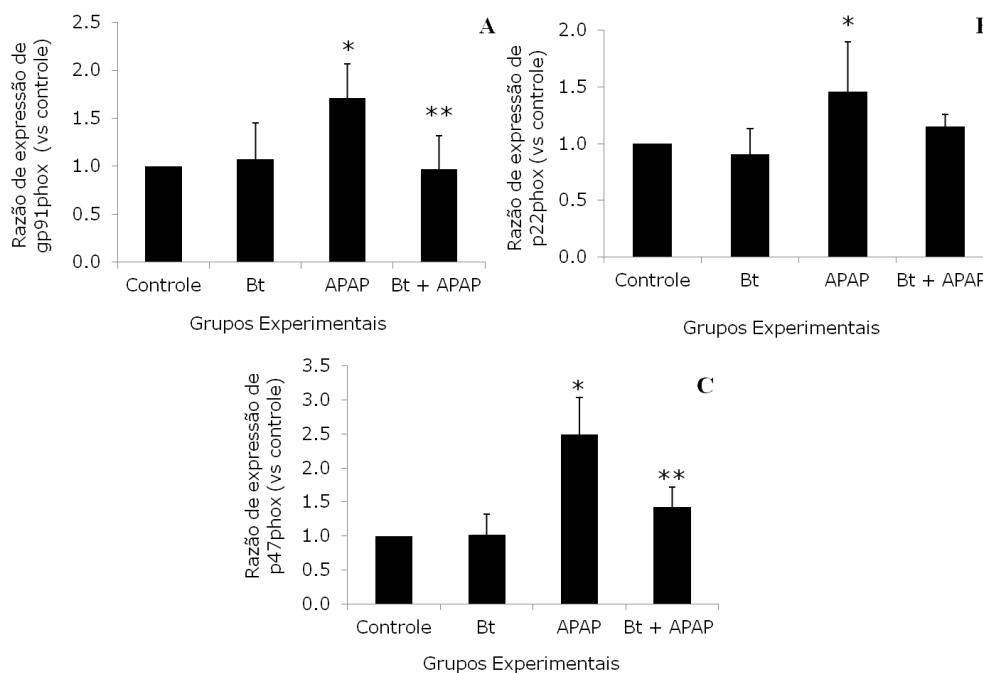


Figura 13 – Efeito do extrato de *B. trimera* sobre a expressão gênica das subunidades da NADPH oxidase em neutrófilos de ratos 24 horas após a intoxicação com APAP. Os ratos foram tratados com uma dose de 600 mg/kg do extrato de *B. trimera* 1 hora antes da administração de 835 mg/kg APAP. (A) gp91^{phox}, (B) p22^{phox} and (C) p47^{phox}. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=8). *p < 0.05 comparado ao controle, **p < 0.05 comparado ao grupo APAP.

5.3.2 – Efeito do extrato de *B. trimera* sobre a produção de NO e a expressão gênica da iNOS

A **Figura 14A** mostra que os neutrófilos de ratos intoxicados com APAP apresentaram um aumento significativo na produção de NO ($42.20 \pm 23.78 \mu\text{M}$) quando comparado aos neutrófilos de ratos controles ($22.38 \pm 6.31 \mu\text{M}$). Já em neutrófilos de animais pré-tratados com o extrato de *B. trimera* e subsequentemente intoxicados com APAP, foi observado uma redução na produção de NO ($22.83 \pm 14.86 \mu\text{M}$) em relação aos neutrófilos de ratos que receberam somente APAP. Os animais tratados unicamente com extrato de *B. trimera* não apresentaram variação na produção de NO.

Para avaliar a influência do extrato de *B. trimera* sobre a expressão da iNOS, enzima responsável pela produção de NO em neutrófilos, avaliamos os níveis de mRNA desta enzima (**Figura 14B**). Nossos resultados mostraram que a administração de APAP

aumentou significativamente a expressão da iNOS (623%) quando comparado ao grupo controle. Neutrófilos de ratos pré-tratados com extrato de *B. trimera* e em seguida intoxicados com APAP apresentaram níveis de mRNA menores em relação ao grupo APAP.

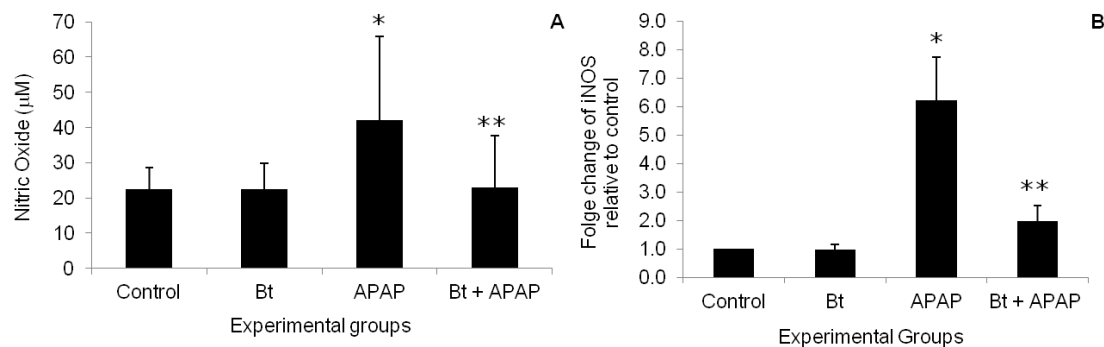


Figura 14 - Efeito do extrato de *B. trimera* sobre a produção de NO (A) e sobre a expressão do gene da iNOS (B) em neutrófilos de ratos 24 horas após a intoxicação com APAP. Os ratos foram tratados com uma dose de 600 mg/kg do extrato de *B. trimera* 1 hora antes da administração de 835 mg/kg APAP. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=8). *p < 0.05 comparado ao controle, **p < 0.05 comparado ao grupo APAP.

5.3.3 – Efeito do extrato de *B. trimera* sobre a atividade e expressão gênica das enzimas antioxidantes CAT e Zn-SOD

Para verificar uma possível influência do extrato de *B. trimera* sobre o sistema de defesa antioxidante, avaliamos a atividade e os níveis de mRNA das enzimas CAT (A) e Zn-SOD (B). A atividade total das enzimas antioxidantes avaliadas no presente estudo foi significativamente maior em neutrófilos de ratos intoxicados com APAP. No entanto, neutrófilos de animais pré-tratados com o extrato de *B. trimera* e posteriormente intoxicados com APAP apresentaram uma significativa redução na atividade dessas enzimas. Os níveis de mRNA da CAT (C) e da Zn-SOD (D) não diferiram significativamente entre os grupos (**Figura 15**).

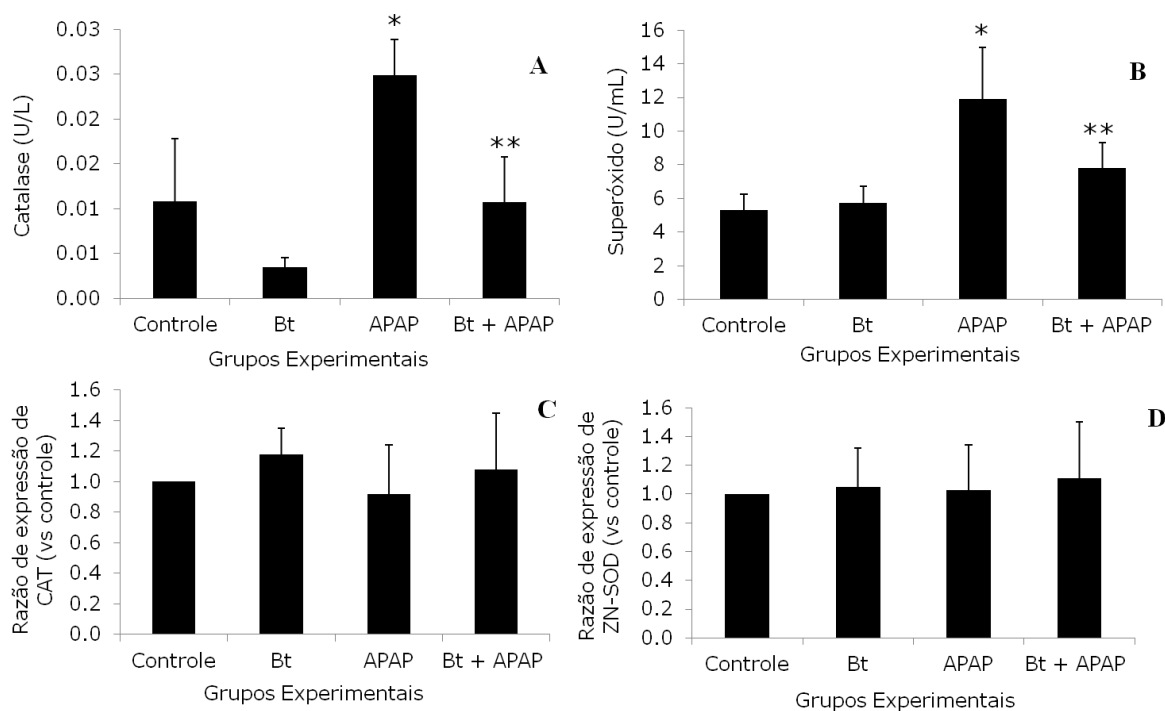


Figura 15 - Efeito do extrato de *B. trimera* sobre a atividade e sobre a expressão gênica das enzimas CAT e Zn-SOD em neutrófilos de ratos 24 horas após a intoxicação com APAP. Os ratos foram tratados com uma dose de 600 mg/kg do extrato de *B. trimera* 1 hora antes da administração de 835 mg/kg APAP. (A) atividade de CAT, (B) atividade de SOD total, (C) expressão do gene da CAT e (D) expressão do gene da Zn-SOD. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=8). *p < 0.05 comparado ao controle, **p < 0.05 comparado ao grupo APAP.

5.4 - Efeito do extrato de *B. trimera* sobre o metabolismo oxidativo em fígado de ratos intoxicados com APAP.

5.4.1 – Efeito do extrato de *B. trimera* sobre os marcadores de danos hepatocelular

Para determinar o efeito hepatoprotetor de *B. trimera* em relação à lesão hepática induzida por APAP, os níveis séricos de ALT e AST, nos diferentes grupos experimentais, foram analisados. Estas enzimas fornecem uma evidência bioquímica indireta do dano hepatocelular. A **Figura 16** mostra a atividade dessas transaminases nos diferentes grupos. A atividade de ALT e AST foram significativamente aumentada (p < 0,05) de 9,8 e 6,3 vezes, respectivamente, em animais intoxicados com APAP. Em contrapartida, o tratamento com *B. trimera* inibiu significativamente o aumento na atividade tanto da ALT quanto da AST, que se verificou ser de 5,0 e 3,6 vezes inferior em relação aos animais que receberam somente APAP, respectivamente.

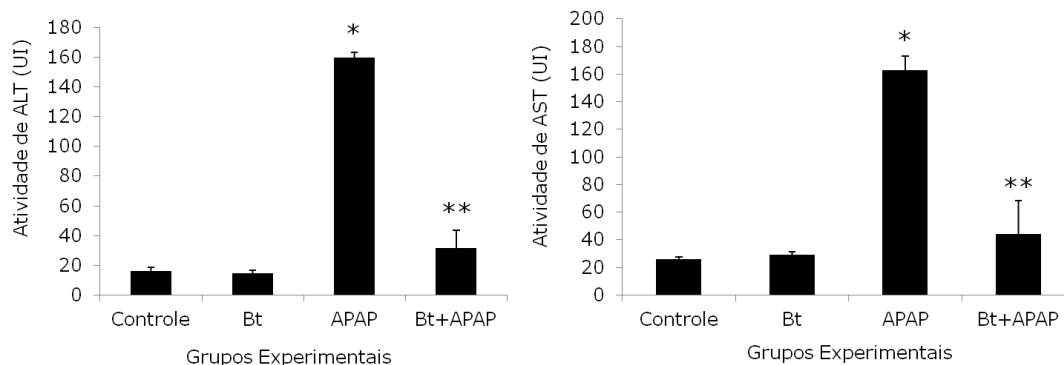


Figura 16 – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a atividade das enzimas ALT e AST no soro de ratos 24 horas após a intoxicação com APAP. Os ratos foram tratados com uma dose de 600 mg/kg do extrato de *B. trimera* 1 hora antes da administração de 835 mg/kg APAP. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=8). *p < 0.05 comparado ao controle, **p < 0.05 comparado ao grupo APAP.

5.4.2 – Efeito do extrato de *B. trimera* sobre os marcadores de dano oxidativo

Os danos oxidativos em proteínas e lipídeos foram avaliados através da medição dos marcadores indiretos de estresse oxidativo, proteína carbonilada e TBARS, respectivamente, presentes no tecido hepático. Os resultados mostrados na **Figura 17** indicam um aumento significativo na concentração de proteínas carboniladas no fígado de animais intoxicados com APAP quando comparado ao fígado de animais do grupo controle. Contudo, o tratamento com o extrato de *B. trimera* em ratos intoxicados com APAP, resultou em uma redução na concentração hepática de proteínas carboniladas quando comparado aos animais do grupo que recebeu somente APAP. Em relação aos lipídeos, observamos um aumento da peroxidação lipídica em ratos intoxicados com APAP em comparação com os animais do grupo controle. Além disso, também observamos que o tratamento com *B. trimera* foi capaz de reduzir a lipoperoxidação, quando comparado ao grupo não tratado com o extrato. Assim, estes resultados analisados em conjunto sugerem que o tratamento com *B. trimera* foi capaz de minimizar os danos oxidativos em proteínas e lipídeos decorrentes da superdosagem de APAP.

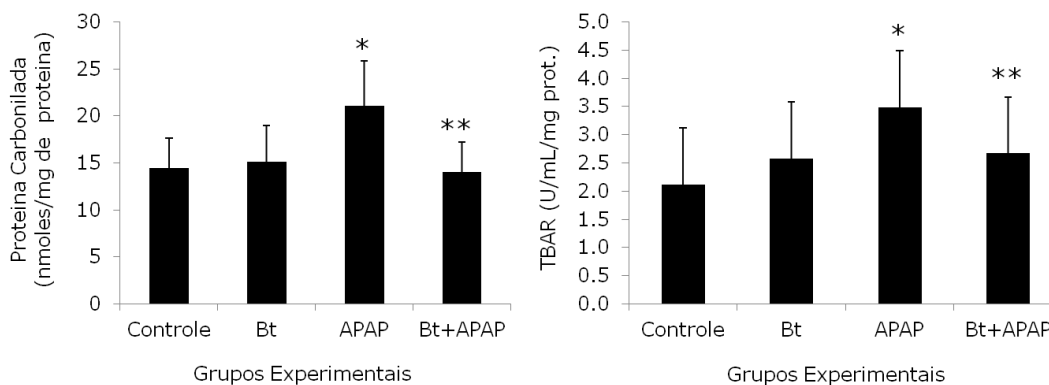


Figura 17 – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre os níveis de proteínas carboniladas e TBAR no fígado de ratos 24 horas após a intoxicação com APAP. Os ratos foram tratados com uma dose de 600 mg/kg do extrato de *B. trimera* 1 hora antes da administração de 835 mg/kg APAP. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=8). *p < 0.05 comparado ao controle, **p < 0.05 comparado ao grupo APAP.

5.4.3 – Efeito do extrato de *B. trimera* sobre parâmetros antioxidantes

Para investigar o possível efeito antioxidante do extrato de *B. trimera* foram avaliados compostos e enzimas antioxidantes tais como, os níveis de glutathiona total, os níveis de mRNA e a atividade das enzimas antioxidantes intracelulares.

SOD e CAT são enzimas que funcionam coordenadamente para remover os radicais superóxido do sistema celular. O fígado de animais intoxicados com APAP apresentaram um aumento na expressão de Zn-SOD (A) e Mn-SOD (B) quando comparado ao fígado de animais do grupo controle, porém, somente na Zn-SOD esse aumento foi significativo. Este aumento na expressão das diferentes isoformas de SOD foi acompanhado por um aumento da atividade total desta enzima no grupo intoxicado com APAP (D) ($0,33 \pm 0,07$ unidades / mg de proteína) em relação ao grupo controle ($0,24 \pm 0,036$ unidades / mg de proteína). No grupo tratado com *B. trimera* e em seguida intoxicado com APAP, os níveis de mRNA e a atividade da SOD foram significativamente menores do que os valores encontrados no grupo que recebeu somente APAP. Em relação à CAT, observamos que os níveis de mRNA e atividade desta enzima foram reduzidos significativamente (p < 0.05) nos ratos intoxicados com APAP. Esta diminuição na expressão e na atividade foi revertida no grupo tratado com *B. trimera* e, em seguida, intoxicado com APAP (**Figura 18**).

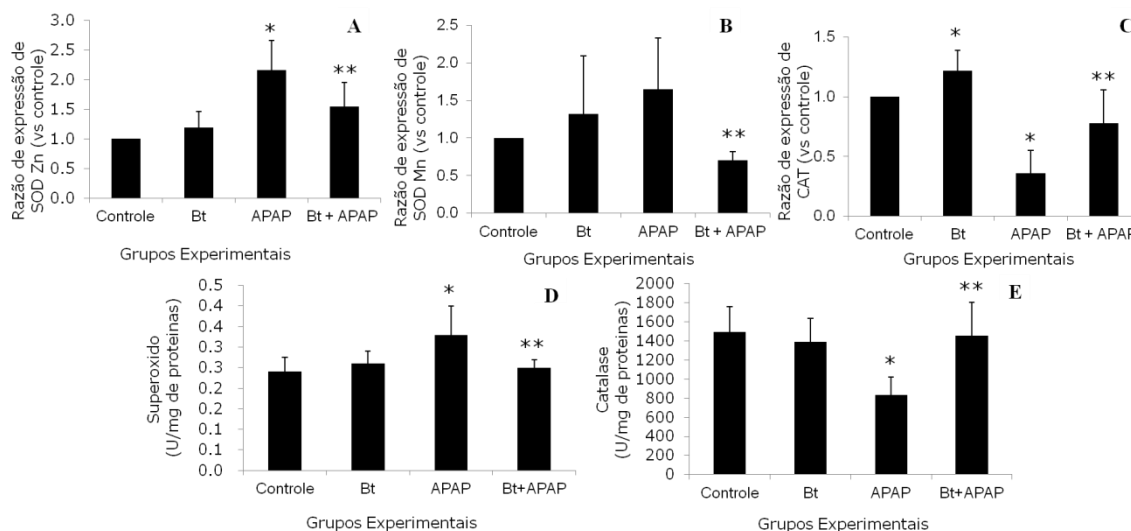


Figura 18 – Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a expressão de mRNA das enzimas Zn-SOD (A), Mn-SOD (B) e CAT (C) e sobre a atividade de SOD total (D) e CAT (E) em fígado de ratos 24 horas após a intoxicação com APAP. Os ratos foram tratados com uma dose de 600 mg/kg do extrato de *B. trimera* 1 hora antes da administração de 835 mg/kg APAP. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=8). * $p < 0.05$ comparado ao controle, ** $p < 0.05$ comparado ao grupo APAP.

A **Figura 19** mostra que houve um aumento significativo na expressão do gene γ CGL (A) no fígado dos animais intoxicados com o APAP. O tratamento com *B. trimera* foi capaz de alterar este perfil, promovendo a diminuição da expressão deste gene. Apesar do aumento da expressão gênica de γ CGL, houve uma diminuição na concentração de glutathiona total no fígado dos animais intoxicados com APAP, no entanto, o tratamento com *B. trimera* foi capaz de aumentar significativamente a concentração de glutathiona total quando comparado aos animais que foram intoxicados com APAP (B).

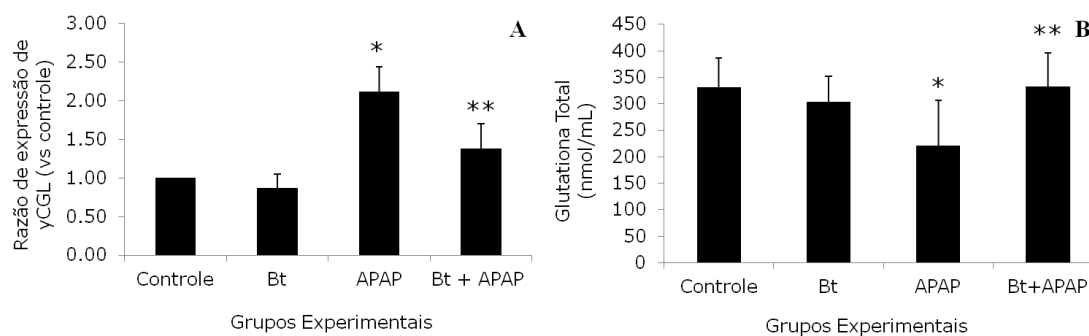


Figura 19 - Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a expressão de mRNA de yCGL (A) e sobre os níveis de glutathiona total em fígado de ratos 24 horas após a intoxicação com APAP. Os ratos foram tratados com uma dose de 600 mg/kg do extrato de *B. trimera* 1 hora antes da administração de 835 mg/kg APAP. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=8). *p < 0.05 comparado ao controle, **p < 0.05 comparado ao grupo APAP.

Os resultados apresentados na **Figura 20** mostram uma diminuição nos níveis de mRNA e da atividade enzimática da GPx (A e B) e da GR (C) no fígado de ratos intoxicados com APAP em comparação com os ratos do grupo controle. O tratamento com *B. trimera* foi capaz de aumentar significativamente os níveis de mRNA da enzima GPx bem como a atividade da enzima GR em fígado de ratos intoxicados com APAP. Nenhuma mudança foi observada na atividade da GPx e GR no fígado dos ratos que receberam apenas extrato.

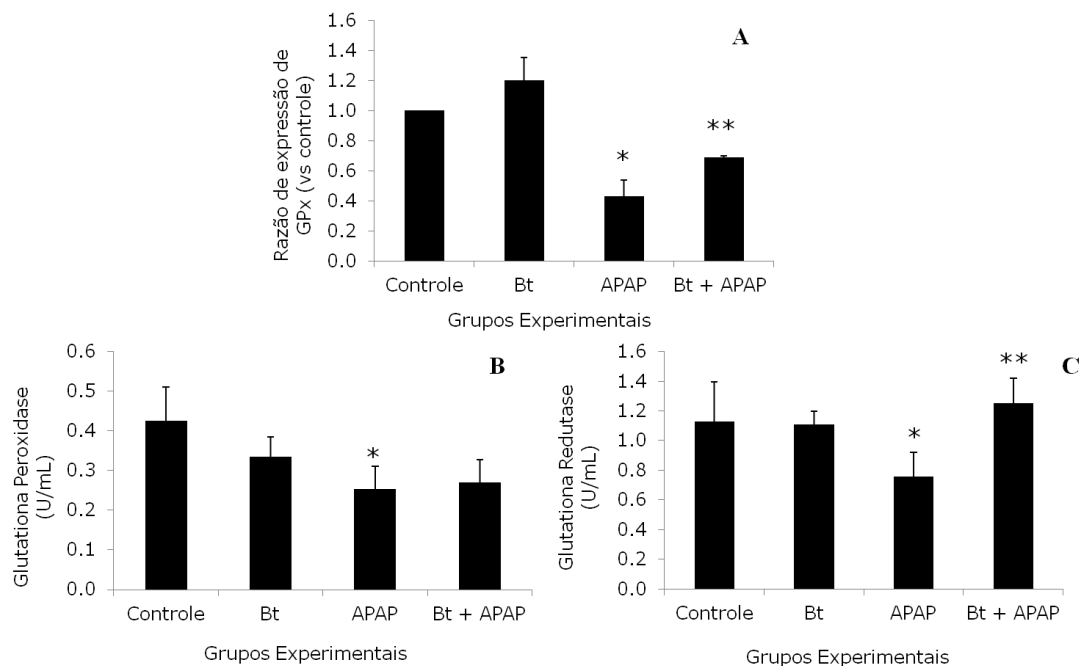


Figura 20 - Efeito do extrato hidroalcoólico de *B. trimera* sobre a expressão de mRNA de GPx (A) e sobre a atividade da enzima Glutathiona Peroxidase (GPx) (B), e atividade da enzima Glutathiona Redutase (C) em fígado de ratos 24 horas após a intoxicação com APAP. Os ratos foram tratados com uma dose de 600 mg/kg do extrato de *B. trimera* 1 hora antes da administração de 835 mg/kg APAP. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=8). *p < 0.05 comparado ao controle, **p < 0.05 comparado ao grupo APAP.

5.4.4 – Efeito do extrato de *B. trimera* sobre a histopatologia hepática

Histologicamente, na avaliação óptica dos tecidos corados em H&E não foram reveladas alterações significativas na estrutura tecidual no grupo controle (**Figura 21A**) e grupo *B. trimera* (**Figura 21B**). No grupo intoxicado com APAP (**Figura 21C**), o dano celular foi visível sob a forma de degeneração hidrópica, inflamação e hemorragia. O tratamento com *B. trimera* (**Figura 21D**) melhorou consideravelmente a morfologia do fígado em comparação aos ratos intoxicados com APAP.

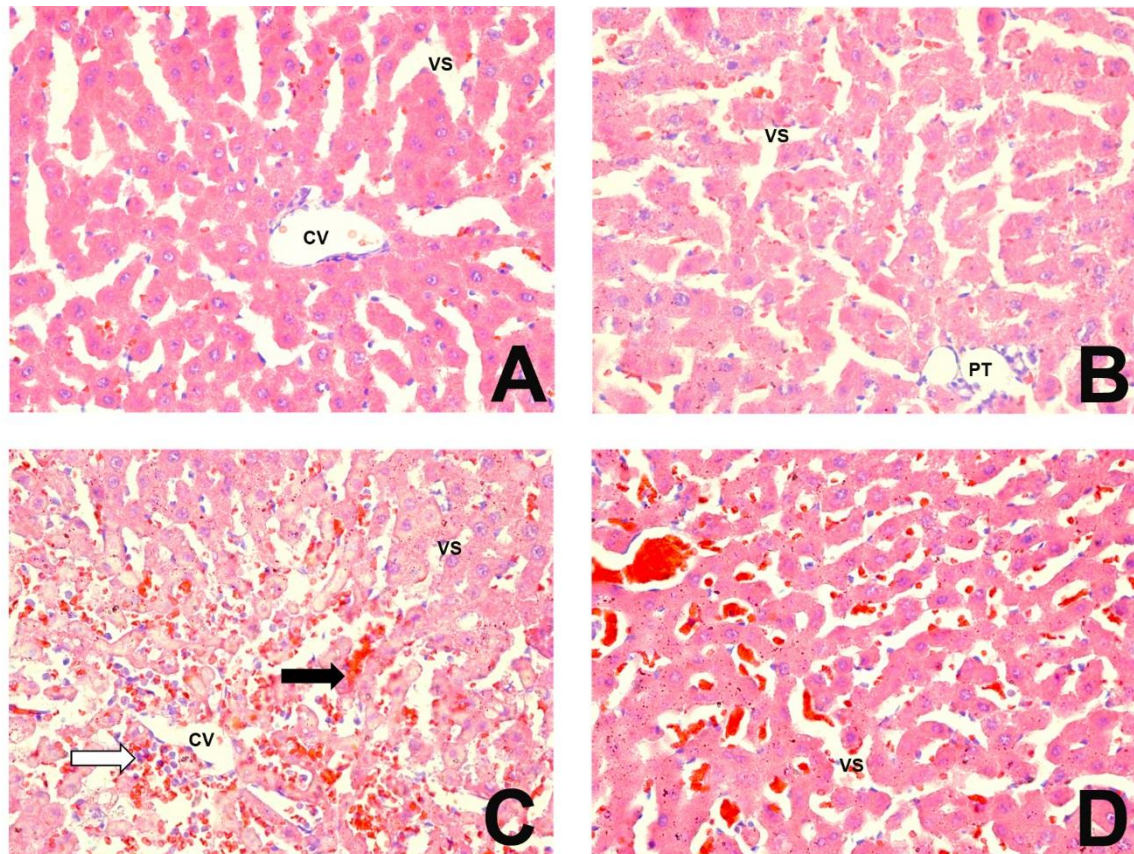


Figura 21 - Secção de fígado de ratos após 24 horas de administração com PBS (A), extrato de *B. trimera* (B), APAP (C) e extrato de *B. trimera* e APAP (D), que mostra: A- fígado de ratos normais sem alterações hepáticas significativas; B – fígado normal de ratos sem alterações hepáticas significativas; C - lesões hepáticas, degeneração hidrópica, inflamação (seta branca) e hemorragia (seta preta); D – hepatócitos poligonais bem formado e relativa redução da degeneração hidrópica. VC = Veia Central; VS = Seios Venosos; PT = Portal Tríades. Secções de fígado foram coradas com H & E (400x).

Capítulo 6- Discussão

6- DISCUSSÃO

Pesquisas que visam propor novas estratégias de intervenção terapêutica incluem cada vez mais a utilização de extratos de plantas e outros produtos naturais. No Brasil, cerca de 40% dos produtos farmacêuticos produzidos tem princípios ativos retirados de plantas, entretanto, a transformação de plantas em medicamentos deve priorizar a preservação dos constituintes químicos e farmacológicos do vegetal, garantindo sua ação biológica, segurança e utilização (Lima, 2006).

Dentre as diversas espécies da farmacopéia brasileira e internacional encontra-se *B. trimera*, uma erva muito popular e conhecida com o nome comum de carqueja. De acordo com as diversas pesquisas realizadas, esta planta apresenta uma grande variedade de princípios ativos (Jamart Web Creation, 2001). De fato, ao realizarmos em nosso laboratório, através da técnica de HPLC, uma análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *B. trimera*, encontramos diversos picos associados a compostos de alta polaridade. Dentre esses picos observamos que alguns eram bem semelhantes a dois flavonoides já bem descritos para *B. trimera*, os flavonoides quercetina e rutina. Nishimura et al. (2013), demonstrou que o flavonoide quercetina foi capaz de inibir a produção de ERO em neutrófilos durante a atividade microbicida. Por outro lado, Al-Rejaie et al. (2013) trabalhando com um modelo de hipercolesterolemia, evidenciou que a rutina foi capaz de regular a expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo e com isso reverter a hepatotoxicidade gerada por uma dieta rica em colesterol.

Apesar desses efeitos biológicos descritos, há poucos estudos relacionados à toxicidade de *B. trimera*. Recentemente foram encontradas alterações histopatológicas no fígado de ratas grávidas tratadas com um extrato hidroetanólico da planta (Grance et al., 2008), somado a isto, Rodrigues et. al, (2009), mostraram que *B. trimera* produziu alguns efeitos genotóxicos e mutagênicos, estando estes, relacionados ao consumo de altas doses do extrato. Sendo assim, para avaliarmos um possível efeito citotóxico do extrato de *B. trimera* incubamos células hepáticas da linhagem HepG2 na presença ou ausência do extrato a fim de obter uma melhor relação da viabilidade celular / toxicidade. Após os ensaios, observamos que o extrato hidroalcoólico não apresentou uma toxicidade significativa, uma vez que manteve uma viabilidade de 89.0% e 98.6% após um tempo de incubação de 1h e 24h, respectivamente.

Uma vez que a quercetina e a rutina são associadas ao controle no balanço redox e que o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* não apresentou citotoxicidade, resolvemos

avaliar a capacidade antioxidante do extrato em “sequestrar” o radical DPPH•. Nossos resultados mostraram que o extrato de *B. trimera* apresentou alta capacidade antioxidante de maneira dose-dependente, mesmo em concentrações muito baixas. Estes dados corroboram com diversos trabalhos descritos na literatura que mostram a capacidade antioxidante do extrato de *B. trimera* sobre diferentes fontes de radicais. Dentre eles podemos destacar o de Dias et al. (2009) que verificaram o efeito antioxidante do extrato hidroetanólico da carqueja diante de um percentual de inibição do radical DPPH próximo a 70% e o de Oliveira, et al. (2012) que testaram vários tipos de extrato de *B. trimera* e encontraram maior atividade antioxidante no extrato fenólico, sendo esta atividade maior do que a do antioxidante utilizado de referência (ácido ascórbico).

Apesar desses resultados, a avaliação da atividade antioxidante baseada em metodologias *in vitro* deve ser feita com cautela, uma vez que as mesmas não consideram fatores como biodisponibilidade e estabilidade do composto *in vivo*, retenção dos antioxidantes pelos tecidos e atividade celular (Huang et al. 2005). Por isso, avaliamos também as propriedades antioxidantes *in vivo* do extrato de carqueja em neutrófilos e fígado de ratos intoxicados com APAP.

Para realizarmos esta avaliação, o primeiro passo foi caracterizar o modelo de inflamação, a fim de se descobrir a partir de qual tempo, após a dose de APAP, encontraríamos uma maior lesão hepática e, conseqüentemente, uma maior ativação e recrutamento de neutrófilos periféricos. Estudos utilizando APAP como um modelo de inflamação, tais como os de Liu et al. (2006) e de Lawson et al. (2000) demonstraram que a administração de uma dose tóxica de APAP leva ao recrutamento de neutrófilos e, conseqüentemente, um aumento na produção de ERO. Neste contexto, o presente estudo demonstrou através da atividade de ALT e AST, que a administração de APAP levou a uma significativa injúria hepática após 24 h da sua administração. Estes dados corroboram com muitos outros trabalhos descritos na literatura que encontraram efeito similar com altas doses de APAP (Smith, et al., 1998, Meotti, et al., 2006).

Williams et al., (2014), demonstraram que os neutrófilos periféricos, mesmo não estando envolvidos na hepatotoxicidade induzida por APAP, apresentaram uma alta expressão de CD11b, cuja função é promover a fagocitose de microrganismos opsonizados pelos fragmentos do complemento e uma elevada produção de espécies reativas, tanto as derivadas do oxigênio quanto do nitrogênio. Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, observamos que o extrato de *B. trimera* foi eficiente

para regular a produção de ERO e ERN em neutrófilos periféricos de ratos intoxicados com APAP (Pádua et al., 2010). A partir destes resultados nos questionamos se este efeito biológico atribuído ao extrato hidroalcoólico de *B. trimera* estava ou não relacionado com a modulação das enzimas produtoras de espécies reativas em neutrófilos, NADPH oxidase e iNOS e das enzimas antioxidantes SOD e CAT.

Em relação à NADPH oxidase, os animais intoxicados com APAP apresentaram uma maior expressão das subunidades gp91^{phox}, p22^{phox} e p47^{phox}. Estes resultados podem explicar o aumento das EROs observado por Pádua et al., (2010) em neutrófilos de ratos intoxicados com este fármaco, bem como, os resultados relatados por Gujral et al. (2004), que observaram que a inibição da NADPH oxidase em neutrófilos funcionava como um fator protetor contra a citotoxicidade, sugerindo que os oxidantes gerados por essa enzima são os mediadores predominantes no mecanismo de lesão *in vivo*. O extrato hidroalcoólico de *B. trimera* foi capaz de reduzir significativamente a expressão de gp91^{phox} e p47^{phox} em neutrófilos de animais pré-tratados com este extrato e em seguida, intoxicados com APAP. Estudos realizados por Tauber et al, (1984) e Poolman et al, (2005) mostraram que diferentes polifenóis como, a quercetina e o resveratrol, são capazes de inibir a atividade da NADPH oxidase. Essa inibição está relacionada ao fato desses polifenóis diminuírem a expressão das subunidades formadoras desta enzima e inibir a atividade da proteína quinase C, uma enzima que cataliza um importante passo na ativação da NADPH oxidase de fagócitos, uma vez que ela fosforila a subunidade p47^{phox}. Esse efeito encontrado sugere que o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* apresenta propriedades antioxidantes em neutrófilos também em ensaios *in vivo* e que os flavonóides possuem uma grande habilidade em modular enzimas e receptores celulares (Hodek, et al., 2002).

Em 1998 Gardner et al. relataram em seu trabalho que o óxido nítrico é um importante mediador da hepatotoxicidade induzida pelo APAP. De fato, em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Os nossos resultados mostraram que os neutrófilos de ratos intoxicados com APAP produziram uma maior quantidade de NO quando comparado aos neutrófilos de ratos controle. Além disso, essa maior produção de NO pode estar relacionada com um aumento da expressão de iNOS. Curiosamente, o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* reduziu significativamente a produção de NO em neutrófilos de animais pré-tratados

com o extrato e, em seguida, intoxicados com APAP. Esta redução foi acompanhada por uma menor expressão do gene da iNOS.

A possibilidade que o NO seja crucial para hepatotoxicidade induzida por APAP tem sido sugerida pelo fato da aminoguanidina, um inibidor da iNOS, atenuar os danos provocados pela overdose de APAP (Gardner et al., 1998). Nesse contexto, o aumento na produção de NO que encontramos em nossos resultados em virtude da administração de APAP pode ser confirmada em estudos de natureza similar, em que o tratamento de ratos (Gardner, et al., 2002) e camundongos (Michael, et al., 1999) com doses hepatotóxicas de APAP resultou em danos na região centrolobular do fígado, sendo este dano associado a uma maior expressão da iNOS (Gardner, et al., 2002). Em adição, Yanagisawa et al., (1998), relatou que a indução de iNOS pode ter um papel na progressão da necrose tubular aguda induzida por xenobióticos.

Apesar de não haver estudos associando o tratamento com *B. trimera* e a modulação de NO, podemos inferir que a redução do NO em neutrófilos periféricos que essa planta provocou, pode estar relacionada a capacidade de alguns compostos químicos presentes no extrato, em sequestrar as moléculas de NO formadas e/ou inibir a atividade da iNOS. De fato, muitos compostos químicos presentes em extratos vegetais podem modular o balanço redox. Masella et al. (2005), por exemplo, demonstraram que os polifenóis podem oferecer proteção indireta contra o estresse oxidativo por meio da ativação da transcrição de genes de enzimas antioxidantes. Diante disso, avaliamos em neutrófilos periféricos de ratos intoxicados com APAP a atividade das duas principais enzimas antioxidantes presentes no organismo, a SOD e CAT. A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e O_2 , enquanto a CAT catalisa a decomposição de H_2O_2 à água. Os neutrófilos de animais intoxicados com APAP apresentaram uma maior capacidade antioxidante, como evidenciado no aumento da atividade da SOD e CAT. Esses resultados indicam a presença de alguma variação no equilíbrio oxidante - antioxidante em neutrófilos de ratos intoxicados com APAP, uma vez que um aumento na atividade dessas enzimas pode estar relacionado com uma maior produção de espécies reativas no corpo (Hayes et al., 2005). Em contrapartida os animais tratados com o extrato de *B. trimera* e em seguida intoxicados com APAP apresentaram uma menor atividade dessas enzimas, entretanto não observamos alterações nos níveis de mRNA de SOD e CAT em nenhum dos grupos experimentais. Estes resultados sugerem que o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* foi capaz de regular a atividade destas enzimas sem alterar os níveis transcricionais. De fato, alterações no balanço

oxidante/antioxidante, como as induzidas pelo APAP, por exemplo, podem afetar a translocação de fatores de transcrição sensíveis ao estado redox para o núcleo. Portanto a inalteração nos níveis de mRNA de enzimas antioxidantes pode ser devida à oxidação de fatores de transcrição responsáveis pelo início da maquinaria do processo de transcrição das enzimas antioxidantes (Sadi et al. 2008).

Sendo assim, a análise dos resultados encontrados para neutrófilos, torna o nosso grupo de pesquisa o primeiro a demonstrar que em neutrófilos periféricos de ratos intoxicados com APAP, o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* é capaz de modular a produção de espécies reativas através da regulação na expressão da iNOS e das subunidades gp91^{phox} e p47^{phox} da NADPH oxidase (**Figura 22**).

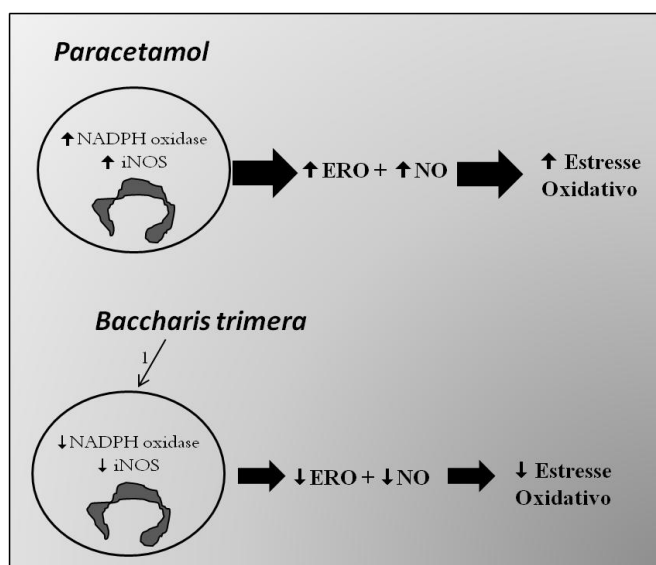


Figure 22 – Mecanismo proposto para a modulação das espécies reativas pelo extrato de *B. trimera*. (1) Proteção indireta pela inibição de fontes capazes de gerar espécies reativas, tais como NADPH oxidase e iNOS.

Uma vez que o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* foi capaz de restaurar o desequilíbrio ROS/NO e modular a ativação de neutrófilos periféricos, avaliamos também o efeito desse extrato sobre o status antioxidante hepático de ratos intoxicados com APAP. É bem descrito na literatura que a hepatotoxicidade induzida pelo APAP é resultado de um quadro de estresse oxidativo que ocasiona, em virtude de uma depleção de glutathione, alterações em proteínas mitocondriais que levam a uma inibição da respiração com consequente morte celular (Jaeschke et al., 2012). Portanto, para investigar o efeito hepatoprotetor do extrato de *B. trimera* analisamos, inicialmente, a atividade das enzimas hepáticas AST e ALT.

A AST e a ALT são enzimas intracelulares presentes em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam essas aminotransferases para a circulação (Motta, 2003). Nosso estudo mostrou que o APAP causou uma elevação significativa na atividade de ALT e AST. Em contrapartida, o pré-tratamento com o extrato da planta restaurou essa atividade a valores semelhantes ao do controle. Altas doses de APAP têm sido relacionadas com uma maior atividade séria de ALT e AST (Kozer et al., 2003; Olaleye e Rocha, 2008). A habilidade de *B. trimera* em prevenir o aumento na atividade dessas enzimas evidencia que seus constituintes químicos exercem uma importante atividade hepatoprotetora.

Além da análise das atividades dessas enzimas hepáticas, os produtos de estresse oxidativo também têm sido descritos para demonstrar a ocorrência de injúria oxidativa (Perry et al., 2000). Dentre esses produtos estão às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR) e proteínas carboniladas. Os níveis dessas substâncias são usados como marcadores indiretos da peroxidação lipídica e da oxidação proteica, respectivamente, em células hepáticas (Beal, 2002).

Em nossos resultados, animais intoxicados com APAP apresentaram elevados níveis de proteínas carboniladas e de TBAR. Entretanto, o pré-tratamento com o extrato de *B. trimera* foi capaz de reduzir os níveis desses compostos a valores semelhantes aos de seus respectivos controles. Sabe-se que plantas, pelo fato de apresentarem constituintes antioxidantes, são eficientes em reduzir a peroxidação lipídica e a oxidação proteica induzida pelo APAP (Tseng et al., 1997; Patrizia et al., 2005). Uma das explicações para isso, é que estes fitoquímicos são capazes de minimizar o estresse oxidativo no fígado de animais intoxicados com altas doses deste fármaco (Sidhartha et al., 2006).

Pelo fato de *B. trimera* ter mostrado um efeito significativo contra a formação de produtos do estresse oxidativo, avaliamos o seu efeito sobre a expressão e atividade das enzimas antioxidantes. Enzimas antioxidantes celulares desempenham um importante papel na manutenção da homeostase redox sob condições fisiológicas normais. A ação protetora de várias ervas medicinais e seus constituintes ativos ocorre por meio de enzimas antioxidantes (por exemplo, SOD, CAT, GPx e GR), que mantêm o equilíbrio pro-oxidante/antioxidante no corpo. Nossos resultados mostraram que o fígado de animais intoxicados com APAP apresentaram uma expressão gênica mais significativa da isoforma Zn-SOD. Este aumento da expressão gênica foi acompanhado por uma

maior atividade enzimática da SOD. Embora a SOD seja uma enzima antioxidante, alguns estudos sugerem que a sua superexpressão é de fato prejudicial para as células (Gardner et al., 2002). O efeito tóxico das EROs que tem sido observado em muitas células com elevada expressão de SOD tem sido associado a níveis elevados de H_2O_2 e a danos oxidativos decorrentes da formação de $HO\bullet$ (Haan et al., 1996). O tratamento com *B. trimera* foi capaz de regular essa expressão a valores semelhantes ao fígado de animais controle. Dados da literatura demonstram que o consumo de compostos fenólicos pode propiciar um aumento na atividade das defesas antioxidantes ou até mesmo um efeito contrário. Este comportamento dúbil exercido pelos compostos fenólicos depende da origem do estresse oxidativo, do modelo animal utilizado, da defesa antioxidante estudada e do tipo e fonte do antioxidante dietético. (Alia et al., 2003; Breinholt et al., 1999; Dragsted et al., 2004).

Em relação à CAT nossos resultados mostraram que o fígado de animais intoxicados com APAP apresentaram uma menor expressão desta enzima. Esta diminuição da expressão gênica foi acompanhada por uma menor atividade enzimática da CAT. Esses resultados corroboram com outros trabalhos que também observaram uma menor atividade da CAT após uma intoxicação com APAP (Mirochnitchenki et al., 1999; Clive e Parames, 2006). O efeito biológico associado a esta menor atividade da CAT estaria relacionado ao acúmulo de ERO e H_2O_2 , o que poderia agravar o dano hepatocelular iniciado pelo NAPQI. Em contrapartida, animais tratados com o extrato de *B. trimera* e em seguida intoxicados com APAP, foram capazes de reverter a diminuição na atividade da CAT induzida pelo APAP. Isto sugere que os constituintes químicos antioxidantes presentes no extrato, atuaram para facilitar o consumo rápido e eficiente das espécies reativas geradas pela bioativação do APAP pelo citocromo P450 (Olaleye e Rocha, 2008).

Além das enzimas antioxidantes a medição dos níveis de glutathiona total (GSH/GSSG) é considerada como o principal tampão redox em células. A Gama-glutamyl-cisteina sintase (γ CGL) é a enzima que catalisa a etapa limitante na síntese da glutathiona, o mais importante antioxidante celular endógeno (Rahman 1999; Haddad & Harb 2005), uma vez que desempenha uma importante função na remoção de espécies reativas e na proteção dos grupos tióis presentes em biomoléculas (Pastore et al., 2003). Sob condições normais, a glutathiona é encontrada principalmente na sua forma reduzida (GSH) e em quantidades muito pequenas, na sua forma oxidada (GSSG) (Cereser et al.,

2003). Durante o estresse oxidativo ou sob certas condições patológicas, os níveis de GSH e GSSG são significativamente alterados, assim, a determinação da relação GSH/GSSG fornece informações úteis sobre o estado redox das células. A depleção de glutathiona tem sido associada com o aumento da toxicidade de substâncias químicas, incluindo a APAP (Hewawasam et al., 2003).

Nossos resultados mostraram que o fígado de animais intoxicados com APAP, mesmo apresentando uma elevada atividade de γ CGL, apresentou níveis de glutathiona total inferiores aos fígados de animais controle. No entanto, os pré-tratamentos com *B. trimera* aumentou o nível de glutathiona total nos animais tratados com APAP. Estes resultados sugerem que o extrato de *B. trimera* pode exercer suas atividades hepatoprotetora e antioxidante através do aumento das defesas antioxidantes e da elevada capacidade em inibir a formação de radicais livres formados durante a metabolização do APAP (Olaleye et al., 2010).

O mecanismo antioxidante exercido pela glutathiona está diretamente relacionado às enzimas GPx e GR, que são enzimas chaves na manutenção da homeostase redox por protegerem as células da toxicidade provocada pelos radicais livres (Kumari and Kakkar, 2012). Em relação a essas enzimas, nossos resultados mostraram, em fígado de ratos intoxicados com APAP, uma diminuição na atividade da enzima GR e um diminuição nos níveis de mRNA e na atividade da enzima GPx quando comparado ao fígado de animais do grupo controle. GR é uma enzima que tem um papel crítico no estresse oxidativo induzido por APAP, uma vez que a diminuição na sua atividade leva a uma interrupção da reciclagem entre GSSG e GSH e, assim, a uma falta de GSH. Embora o comprometimento da atividade de GR pelo APAP não seja bem compreendido, duas hipóteses têm sido formuladas para explicar essa associação. A primeira defende que a inativação de GR ocorre por uma ação direta das EROs ou aldeídos tóxicos, enquanto a outra, atribui a inatividade da enzima a conjugados formados entre NAPQI e GSH na presença de glutathiona-S-transferase (Roušar et al., 2009).

Em relação à GPx, a baixa atividade desta enzima é uma das primeiras consequências do distúrbio do balanço pró-oxidante/antioxidante (Benabdeslam et al., 1999). A inibição da GPx aumenta a susceptibilidade dos hepatócitos a toxicidade induzida pelo APAP, o que indica que componentes tóxicos gerados durante a metabolização deste fármaco são neutralizados pela ação desta enzima (Adamson e Harman, 1989). Os flavonoides também protegem as células contra a toxicidade

induzida pela APAP, uma vez que eles inibem a peroxidação lipídica e aumentam a concentração de glutathione (Lahouel et al., 2006). Além disso, a indução da expressão de enzimas do sistema de defesa antioxidante por polifenóis resulta principalmente da ativação mediada pelo fator de transcrição Nrf2 através da interação com o elemento de resposta antioxidante (ARE), encontrado na região promotora de muitos genes induzidos por alterações no estado redox (Masella et al.2005). Assim, a capacidade de diferentes extratos de plantas em restaurar a atividade da GPx é, provavelmente, devido à presença dos flavonoides. Com isso, a maior expressão da GPx no fígado de animais tratados com *B. trimera* comparada com a de animais que receberam apenas APAP pode ser um resultado da presença de quercetina e rutina em adição a outros antioxidantes também presentes no extrato da planta.

Diante da menor atividade da enzima GPx, este estudo sugere que a injúria nas células hepáticas induzida pelo APAP, além de estar relacionada à depleção de GSH, pode também ser resultante de um aumento nos níveis de H₂O₂ e hidroperóxidos (Arnaiz et al., 1995). Em outras palavras, os resultados das enzimas antioxidantes, se analisados concomitantemente, nos permite inferir que os animais intoxicados com APAP apresentam elevada concentração de H₂O₂ hepático, visto que a elevada atividade da SOD faz com que haja grande produção desta ERO, e a baixa atividade da CAT e GPx impede que o H₂O₂ gerado seja neutralizado.

Para confirmar o efeito hepatoprotetor do extrato de *B. trimera* sobre os danos provocados pelo APAP, análises histopatológicas foram realizadas. Nossos resultados mostraram que secções do fígado de ratos do grupo controle e do grupo tratado com o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* apresentaram arquitetura celular regular com veia central, espaços sinusoidais e células hepáticas distintas. Em contraste, a secção de fígado de ratos intoxicados com APAP exibiram alterações histopatológicas graves com necrose hepática centrolobular, degeneração gordurosa e linfócitos infiltrantes. A secção de fígado de animais intoxicados com APAP que foram tratados com o extrato de *B. trimera* apresentou uma melhora nas alterações histopatológicas, em comparação ao grupo que recebeu apenas APAP.

Em suma, o presente estudo demonstrou que o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* apresenta um efeito hepatoprotetor contra hepatotoxicidade induzida por APAP em ratos. Os níveis elevados de enzimas antioxidantes e diminuição da quantidade de produtos de peroxidação são sugeridos como sendo os principais mecanismos pelos

quais o extrato hidroalcoólico *B. trimera* impede o desenvolvimento de danos no fígado induzidos por APAP (**Figura 23**).

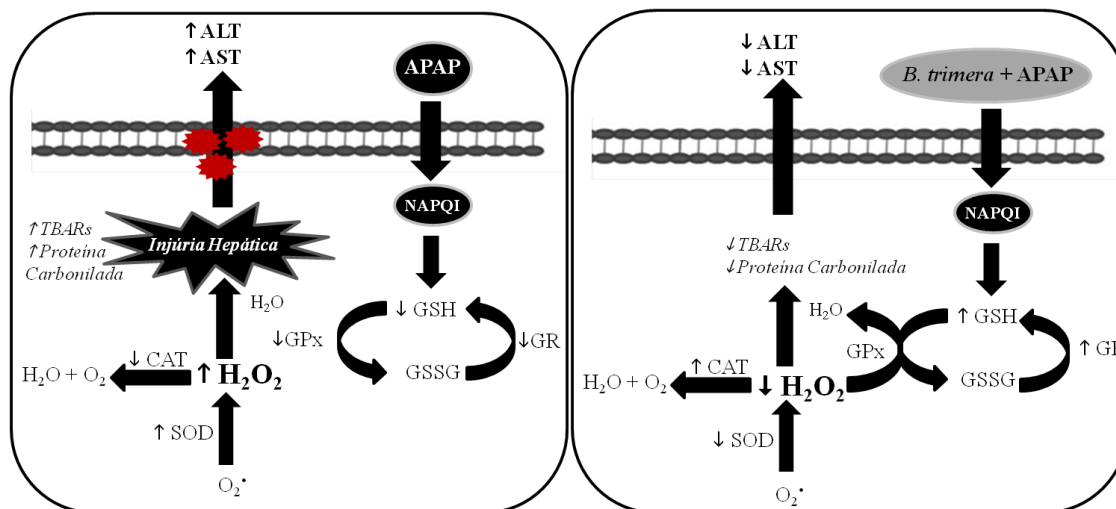


Figura 23 - Diagrama esquemático que mostra o efeito protetor do extrato de *B. trimera* na toxicidade induzida por acetaminofeno. O APAP provoca um quadro de estresse oxidativo uma vez que diminui a atividade de enzimas antioxidantes, como a GR, GPx e CAT, e aumenta a atividade de SOD, o que resulta em uma elevação de H_2O_2 . A perturbação no equilíbrio oxidante / antioxidante provoca estresse oxidativo no sistema celular resultando em lesão hepática, caracterizada pela elevação sérica da ALT e AST. A administração de *B. trimera* manteve o equilíbrio oxidante / anti-oxidante durante a metabolização do APAP, resultando na prevenção de danos hepatocelulares.

Capítulo 7- Conclusão

7- CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que:

- Em neutrófilos de ratos intoxicados com APAP, o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* foi capaz de regular a produção de óxido nítrico e modular da expressão da enzima iNOS. Além disso, o extrato também foi capaz de inibir a expressão da NADPH oxidase, o que pode explicar a menor produção de ERO vista em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa;
- Já em fígado de ratos intoxicados com APAP, o tratamento oral com o extrato de *B. trimera* atenuou a concentração sérica de ALT e AST, reduziu significativamente a formação de produtos do estresse oxidativo, aumentou a expressão e a atividade da enzima catalase, restaurou a concentração hepática de glutathione e por fim, reduziu as lesões hepáticas causadas durante a metabolização do APAP;
- Estes resultados sugerem que os compostos químicos presentes no extrato hidroalcoólico de *B. trimera* apresentam uma importante atividade antioxidante, uma vez que eles foram capazes de inibir a formação de radicais livres formados durante a metabolização do APAP e de regular a expressão de importantes enzimas do metabolismo redox. Essas propriedades tornam o extrato de *B. trimera* um potencial candidato a fármacos capazes de proteger o fígado contra os danos causados pela intoxicação com APAP.

Capítulo 8- Referências Bibliográficas

8- REFERÊNCIAS

Abad, M.J.; Bermejo, P.; Gonzales, E.; Iglesias, I.; Irurzun, A.; Carrasco, L. (1999). Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology* 32, 499-503.

Adamson, G.M.; Harman, A.W. (1989). A role for the glutathione peroxidase/reductase enzyme system in the protection from paracetamol toxicity in isolated mouse hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 38, 3323–30

Aebi, H. Catalase in vitro. (1984). *Methods Enzymology* 105, 121-106.

Aherne, S.A.; O'brien, N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition.* 18(1), 75-81.

Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Uma, H., Kasahara, T.; Yamanouchi, S.; Takido, M.; Kumaki, K.; Tamura, T. (1996). Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti- inflammatory effects. *Phytochemistry* 43, 1255-1260.

Alia, M.; Horcajo, C.; Bravo, L.; Goya, L. (2003). Effect of grape antioxidant dietary fiber on total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nutr Res.* 23, 1251– 1267.

Al-Rejaie, S.S.; Aleisa, A.M.; Sayed-Ahmed, M.M.; AL-Shabanah, O.A.; Abuhashish, H.M.; Ahmed, M.M.; Al-Hosaini, K.A.; Hafez, M.M. (2013). Protective effect of rutin on the antioxidant genes expression in hypercholesterolemic male Westar rat. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13, 136

Ames, B.N.; Cathcart, R.; Schwiers, E.; Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 78 (11), 6858- 6862.

Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 7915-7922.

Arnaiz, S.L.; Llesuy, S.; Cutrin, J.C.; Boveris, A. (1995). Oxidative stress by acute acetaminophen administration in mouse liver. *Free Radic Biol Med.* 19, 303-310.

Assari, T. (2006). Chronic Granulomatous Disease: fundamental stages in our understanding of CGD. *Medical Immunology* 5 (4), 1-8.

Avancini, C.A.M.; Wiest, J.M.; Mundstock, E. (2000). Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D. C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 52(3), 1-7.

Babior, B.M. (1994). Activation of the respiratory burst oxidase. *Environmental Health Perspectives* 102 (10), 53-56.

Bagchi, K.; Puri, S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern Mediterranean Health Journal* 4, 350–360.

Bank, N.; Aynedjian, H.S. (1993). Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int.* 43 (6), 1306-1312.

Barreiros, A.L.B.S.; David, J.P.; David, J.M. (2006). Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. *Química Nova* 29, 113-123.

Bautista, A.P.; Mészáros, K.; Bojta, J.; Spitzer, J.J. (1990). Superoxide anion generation in the liver during the weanling stage of endotoxemia in rats. *J Leukoc Biol.* 48, 123–128.

Bautista, A.P.; Spitzer, J.J. (1992). Platelet activating factor stimulates and primes the liver, Kupffer cells and neutrophils to release superoxide anion. *Free Radic. Res. Commun.* 17, 195–209.

Bautista, A.P.; Spolarics, Z.; Jaeschke, H.; Smith, C.W.; Spitzer, J.J. (1994). Antineutrophil monoclonal antibody (1F12) alters superoxide anion release by neutrophils and Kupffer cells. *J Leukoc Biol.* 55, 328–335.

Beal, M.F. (2002). Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med.* 32, 797–803.

Bean, J.W. (1945). Effects of oxygen at increased pressure. *Physiol Rev.* 25:1-4. In: Miquel, J. & Ramírez-Boscá, A., 2004. Estrés oxidativo y suplementación antioxidante de la dieta en el envejecimiento, la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria. *Ars. Pharm.* 45(2), 91-109.

Beckman, K.B.; Ames, B.N. (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological reviews* 78 (2), 547-581.

Benabdeslam, H.; Abidi, H.; Garcia, I.; Bellon, G.; Gilly, R.; Revol, A., (1999). Lipid peroxidation and antioxidant defenses in cystic fibrosis patient. *Clin Chem Lab Med.* 37, 511–6.

Bentz, B.G.; Chandra, R.; Haines, G.K.; Robinson, A.M.; Shah, P.; Radosevich, J.A. (2002). Nitric oxide and apoptosis during human head and neck squamous cell carcinoma development. *Am. J. Otolaryngol.* 23 (1), 4-11.

Berna, W.; Auzinger, G.; Dhawan, A.; Wendon, J. (2010). Acute liver failure. *Lancet.*

Berry, E.M.; Kohen R. (1999). Is the biological antioxidant system integrated and regulated? *Medical Hypotheses* 53(5), 397–401.

Bert, P. (1943). *Barometric Pressure: Researches in Experimental Physiology*, translated by Hitchcock MA. Hitchcock FA. Columbus: College Book. In: Miquel J. & Ramírez.

Bibi, Zakia (2008). Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutrition & Metabolism.*

Bicalho, H.M.S.; Gontijo, M.C.; Nogueira-Machado, J.A. (1981). A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. *Journal of Immunology* 40, 115-116.

Bionatus. (2001) Carqueja. Disponível em <http://www.bionatus.com.br/Carqueja3.htm> Capturado em 04/junho/2001.

Biondo, T.M.A.; Tanae, M.M.; Coletta, E.D.; Lima-Landman, M.T.R.; Lapa, A.J.; Souccar, C. (2011). Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: Analysis of underlying mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology* 136, 368–373.

Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91, 179-194.

Bobbio, F.O.; Bobbio, P.A. (1989). *Introdução à química de alimentos*. 2.ed. São Paulo: Varela.

Bona, C.M. (2002). Estaquia, colagem e sombreamento de carqueja. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Bourdi, M.; Masubuchi, Y.; Reilly, T.P. (2002). Protection against acetaminophen-induced liver injury and lethality by interleukin 10: role of inducible nitric oxide synthase. *Hepatology* 35, 289–298.

Brahm, H.S.; Melissa, J.G.A.; Nazmul, H.K.; Wei Han, T.S. (2012). Blackwell Regulation of innate immunity by NADPH oxidase. *Free Radical Biology and Medicine* 53(1),72-80.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28, 25-30.

Brandes, R.; Kreuzer, J. (2005). Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovascular Research* 65, 16-27.

Breinholt, V.; Lauridsen, S.T.; Dragsted, L.O. (1999). Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica* 29, 1227– 1240.

Bruchfeld, J.; Bruchfeld, J.; Aderaye, G.; Palme, I.B. (2000). Sputum concentration improves diagnosis of tuberculosis in a setting with a high prevalence of HIV. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 677-80.

Buege, J.A.; Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52, 302-310.

Cadenas, E. (1995). Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In: SAMI, A. *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. New York: Capman & Hall.

Cai, H.; Harrison, D.G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases – The role of oxidant stress. *Cir Res.* 87, 840.

- Calabro, M.L.; Galtieri, V.; Cutroneo, P.; Tommasini, S.; Ficarra, P.; Ficarra, R. (2004). Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in Citrus bergamia juice. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 349–363.
- Campos-Franco, J.A.; Gonzalez-Quintela; Alende-Sixto, M.R. (2004). Isiniazid induced hyperacute liver failure in a young patient receiving carbamazepine. *Eur J Intern Med* 15, 396-397.
- Carneiro, M.A.A.; Fernandes, G.W. (1996). Herbivoria. *Ciência Hoje, São Paulo* 20, 35-39.
- Carr, A.; Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *The Journal of the Federation of American Societies of Experimental Biology* 13, 1007-1024.
- Carvalho, J.C.T.; Silva, M.C. (2004). Inflamação. In: Carvalho, J.C.T. *Fitoterápicos Anti-inflamatórios – Aspectos Químicos, Farmacológicos e Aplicações Terapêuticas*, Ribeirão Preto: Ed. Tecmedd, 480p.
- Castro, H.G.; Ferreira, F.A. (2000). Contribuição ao estudo das plantas medicinais carqueja (*Baccharis genistelloides*). Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda, 102p.
- Cereser, C.; Guichard, J.; Draï, J.; Bannier, E.; Garcia, I.; Boget, S.; Parvaz, P.; Rovel, A. (2001). Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 752 (1), 123–32.
- Chan, J.Y.; Kwong, M. (2000). Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1517, 19-26.
- Coelho, M.G.P.; Reis, P.A.; Gava, V.B.; Marques, P.R.; Gayer, C.R.; Laranja, G.A.T.; Felzenswalb, I.; Sabino, K.C.C. (2004). Anti-arthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. *Toxicology Letters* 154, 69-80.
- Coffey, M.J.; Coles, B.; O'Donnell, V.B. (2001). Interactions of nitric oxide-derived reactive nitrogen species with peroxidases and lipoxygenases. *Free Radic. Res.* 35 (5), 447-464.
- Cook, N.C.; Samman, S. (1996). Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr.* 7, 66–71.
- Corcoran, G.B.; Mitchell, J.R.; Vaishnav, Y.N.; Horning, E.C. (1980). Evidence that acetaminophen and N-hydroxyacetaminophen form a common arylating intermediate, N-acetyl-p-benzoquinoneimine. *Mol. Pharmacol.* 18, 536–542.
- Correa Júnior, C.; Ming, L.C.; Scheffer, M.C. (1994). Cultivo de plantas medicinais, codimentares e aromáticas. Jaboticabal: FUNEP, 151p.

Cover, C.; Liu, J.; Farhood, A. (2006). Pathophysiological role of the acute inflammatory response during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 216, 98–107.

Dahlin, D.C.; Miwa, G.T.; Lu, A.Y.H.; Nelson, S.D. (1984). N-acetyl-pbenzoquinone imine: a cytochrome P-450 mediated oxidation product of acetaminophen. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA, Washington, DC* 81(5), 1327-1331.

Dahm, L.J.; Schultze, A.E.; and Roth, R.A. (1991). An antibody to neutrophils attenuates alpha-naphthylisothiocyanate induced liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256, 412-420.

Dambach, D.M.; Watson, L.M.; Gray, K.R.; Durham, S.K.; Laskin, D.L. (2002). Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Hepatology* 35, 1093–1103.

Darley-Usmar, V.; Wiseman, H.; Halliwell, B. (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* 369, 131-135.

Dela-Loggia R.; Tubaro, A.; Sosa, S.; Becker, H.; Saar, S.T.; Isaac, O. (1994). The role of triterpenoides in the anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.* 60, 516-520.

Devlin, Thomas. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*, Tradução da sexta edição americana, Editora Blucher, 2002.

Dias, L.F.T. et al. (2009). Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 19(1B), 309-314.

Disponível em: www.rain-tree.com/Carqueja-powder.htm. Acessado em: 14 de agosto de 2013. Carqueja Powder: *Baccharis genistelloides*.

Disponível em: www.teliga.net/2010/11/tecido-glandular-ou-secretor-principais. Acessado em: 12 de março de 2012.

Dragsted, L. O.; Pedersen, A.; Hermetter, A.; Basu, S.; Hansen, M.; Haren, G. R. (2004). The 6-a-day study: effects of fruit and vegetables on markers of oxidative stress and antioxidative defense in healthy nonsmokers. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 1060 –1072.

Espin, J.C.; Soler-Rivas, C.; Wichers, H.J.; Garcia-Viguera, C. (2000). Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. *J Agric Food Chem* 48, 1588-1592.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto: Serviço de Fisiologia. *Fisiologia Hepática – Texto de Apoio*. Dr. Pedro Pimentel Nunes; Prof. Doutor Adelino Leite Moreira Porto, Ano Lectivo 2006 / 2007.

Faurschou, M.; Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes. Infect.* 5 (14), 1317-1327.

- Fennema, O.R. (1993). *Química de los alimentos*. 2.ed. Zaragoza: Acribia.
- Fontanarosa, P.B.; Lundberg, G.D. (1998). Alternative medicine meets science. *Journal of the American Medical Association* 280, 1618-1619.
- Forman, H.J.; Fridovich, I. (1973). Superoxide dismutase: a comparison of rate constants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 158, 396-400.
- Forman, H.J.; Torres, M. (2001). Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine* 22, 189-216.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *Journal of Biological Chemistry* 272, 18515- 18517.
- Galli, Enrique y Feijoo, Luis. Citocromo p- 450 y su importancia clínica revisión actualizada, *Revista de Neuro-Psiquiatría*, 2002.
- Gardner, C.R.; Heck, D.E.; Yang, C.S.; Thomas, P.E.; Zhang, X.J.; DeGeorge, G.L.; Laskin, J.D.; Laskin, D.L. (1998). Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Hepatology* 27, 748–754.
- Gardner, C.R.; Laskin, J.D.; Dambach, D.M.; Sacco, M.; Durham, S.K.; Bruno, M.K.; Cohen, S.D.; Gordon, M.K.; Gerecke, D.R.; Zhou, P.; Laskin, D.L. (2002). Reduced hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking inducible nitric oxide synthase: potential role of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10. *Toxicology and Applied Pharmacology* 184, 27–36.
- Gené, R.M.; Cartana, C.; Rarella, T.; Cañigüeral, S. (1996). Anti-inflammatory and analgesic of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. *Planta Medica* 62, 232-235.
- Gomes-Leal, W.; Corkill, D.J.; Freire, M.A.M.; Picanço-Diniz, C.W.P.; Perry, V.H. (2004). Astrocytosis, Microglia Activation, Oligodendrocyte Degeneration and pyknosis Following Acute Spinal Cord Injury. *Experimental Neurology* 190, 456-467.
- Goodman, L.S. e Gilman, A.G. (1992). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Graham, D.B.; Robertson, C.M.; Bautista, J.; Mascarenhas, F.; Diacovo, M.J.; Montgrain, V.; Lam, S.K.; Cremasco, V.; Dunne, W.M.; Faccio, R. (2007). Neutrophil-mediated oxidative burst and host defense are controlled by a Vav-PLCgamma2 signaling axis in mice. *J Clin Invest.* 117, 3445–3452.
- Grance, S.R.M.; Teixeira, M.A.; Leite, R.S.; Guimarães, E.B.; Siqueira, J.M.; Filii, W.F.O.; Vasconcelos, S.B.S.; Vieira, M.C. (2008). *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. *Ethnopharmacology* 117, 28–33.
- Guengerich, Characterization of human cytochrome P450 enzyme. *FASEB Journal* 1992,6(2):745-748.

Gujral, J.S.; Liu, J.; Farhood, A.; Hinson, J.A.; Jaeschke, H. (2004). Functional importance of ICAM-1 in the mechanism of neutrophil-induced liver injury in bile duct-ligated mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 286, 499–507.

Gum, S.II.; Cho, M.K. (2013). Recent Updates on Acetaminophen Hepatotoxicity: The Role of Nrf2 in Hepatoprotection. *Toxicol. Res.* 29(3), 165-172.

Haan, J.B.; Cristiano, F.; Iannello, R.; Bladier, C.; Kelner, M.J.; Kola, I. (1996). Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum. Mol. Genet.* 5, 283-292.

Haddad, J.J. & Harb, H.L. (2005). L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Mol.Immunol.* 42, 987-1014.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1991). *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford Univ. Press. 198.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free radicals in Biology and Medicine*. 3 ed., Oxford University Press, NY.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Nova York: Oxford University Press 1, 851p.

Hampton, M.B.; Kettle, A.J.; Winterbourn, C.C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* 92 (9), 3007-3017.

Harman, D. (1956). Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.

Hayes, J.D.; Flanagan, J.U.; and Jowsey, I.R. (2005). “Glutathione transferases,” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 51–88.

Hewawasam, R.P.; Jayatilaka, K.A.P.W.; Pathirana, C.; Mudduwa, L.K.B. (2003). Protective effect of *Asteracantha longifolia* extract in mouse liver injury by carbon tetrachloride and paracetamol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 55 (10), 1413–1418.

Hinson, J.A.; Roberts, D.W.; James, L.P. (2010). Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol.* 196, 369-405.

Hjelle, J.J.; and Klaassen, C.D. (1984). Glucuronidation and biliary excretion of acetaminophen in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228, 407–413.

Hodek, P.; Trefil, P.; and Stiborová, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem.-Biol. Interact.* 139, 1–21.

Holme, J.A.; Dhalin, D.C.; Nelson, S.D.; Dybing, E. (1984). Cytotoxic effects of Nacetyl-p-benzoquinone imine, a common arylating intermediate of paracetamol and Nhydroxyparacetamol. *Biochem. Pharmacol.* 33, 401–406.

Holt, M.P.; Cheng, L.; Ju, C. (2008). Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1410–1421.

Huang D.; Ou B. & Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J.Agric.Food Chem.* 53, 1841-56.

Ishida, Y.; Kondo, T.; Kimura, A. (2006). Opposite roles of neutrophils and macrophages in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *Eur J Immunol.* 36, 1028–1038.

Ishida, Y.; Kondo, T.; Ohshima, T.; Fujiwara, H.; Iwakura, Y.; Mukaida, N. (2002). A pivotal involvement of IFN-gamma in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *Faseb J.* 16, 1227-36.

Ito, N.; Fukushima, S.; Hasegawa, A.; Shibata, M.; Ogiso, T. (1983). Carcinogenicity of buthylated hydroxy anisole in F344 rats. *J. The National Cancer Institue.* 27, 1-4.

Itoh K.; Chiba T.; Takahashi S.; Ishii T.; Igarashi K.; Katoh Y.; Oyake T.; Hayashi N.; Satoh K.; Hatayama I.; Yamamoto M.; Nabeshima Y. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 236, 313-22.

Jaeschke, H. (2008). Innate immunity and acetaminophen-induced liver injury: why so many controversies? *Hepatology* 48, 699–701.

Jaeschke, H.; Bajt, M.L. (2006). Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci.*

Jaeschke, H.; Bautista, A.P.; Spolarics, Z.; Spitzer, J.J. (1991). Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic Res Commun.* 15, 277–284.

Jaeschke, H.; Farhood, A.; and Smith, C.W. (1990). Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J.* 4, 3355– 3359.

Jaeschke, H.; Liu, J. (2007). Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity: another perspective (letter). *Hepatology* 45, 1588–1589.

Jaeschke, H.; Williams, C.D.; Ramachandran, A.; Bajt, M.L. (2012). Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver Int.* 32(1), 8–20.

Jamart web creation. (2001). carqueja. disponível em: <<http://www.jamart.com.br/pm/bachtri1.htm>>.Capturado em: 04/junho/2001.

- James, L.P.; Mayeux, P.R.; Hinson, J.A. (2003). Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos.*
- James, L.P.; McCullough, S.S.; Knight, T.R.; Jaeschke, H.; Hinson, J.A. (2003). Acetaminophen toxicity in mice lacking NADPH oxidase activity: role of peroxynitrite formation and mitochondrial oxidant stress. *Free Radic Res.* 37, 1289–1297.
- Johansen J.S.; Harris A.K.; Rychly D.J.; Ergul A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc.Diabetol.* 4, 5.
- Jones D.P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxid.Redox.Signal.* 8, 1865-79.
- Junqueira, L.C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*. 11. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008.
- Kaminnski, H.J.; Andrade, F.H. (2001). Nitric Oxide: biologic effects on muscle and role in muscle diseases. *Neuromuscular disorders* 11, 517-524.
- Karbownik, M.; Reiter, R.J. (2000). Antioxidant effect os melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 225, 9-22.
- Khan, S.A.; Shah, N.; Williams, R.; Jalan, R. (2006). Acute liver failure. *Clin Liver Dis.*
- Kim, J.S., He, L., and Lemasters, J.J. (2003). Mitochondrial permeability transition: A common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 463–470.
- Kinsella, J.E.; Frankel, E.; German, B.; Kanner, J. (1993). Possible mechanism for the protective role of the antioxidant in wine and plant foods. *Food Technology* 47, 85-89.
- Knowles, R.G.; Mocada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298, 249-258.
- Kon, K.; Kim, J.S.; Jaeschke, H.; Lemasters, J.J. (2004). Mitochondrial Permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology.*
- Kong, A.N.; Owuor, E.; Yu, R.; Hebbar, V.; Chen, C.; Hu, R.; Mandlekar, S. (2001). Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab Rev.* 33, 255-71.
- Kozer, E., Evans, S., Barr, J., Greenberg, R., Soriana, I., Bulkowstein, M., et al., 2003. Glutathione, glutathione-dependent enzymes and antioxidant status in erythrocytes from children treated with high-dose paracetamol. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 55, 234-240.
- Kumari, A. and Kakkar, P., 2012. Lupeol prevents acetaminophen-induced in vivo hepatotoxicity by altering the Bax/Bcl-2 and oxidative stress-mediated mitochondrial signaling cascade. *Life Sciences* 90, 561–570.

Lago, J.H.G.; Romoff, P.; Fávero, O.A.; Soares, M.G.; Baraldi, P.T.; Corrêa, A.G.; Souza, F.O. (2008). Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis*. *Química Nova* 31, 727–730.

Lahouel, M.; Soulkour, S.; Seguen, N.; Filastre, J.P. (2006). The protective effect of flavonoids against vinblastine cyclophamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxidation and increasing liver glutathione concentration. *Patholog Biolog.* 52, 314–22.

Lai, L.S.; Chou, S.T.; Chao, W.W. (2001). Studies on the antioxidant activities of Hsian-tso (Mesona procumbens Hemsl) leaf gum. *J. Agricultural and Food Chemistry* 49, 963-968.

Larson, A.M.; Polson, J.; Fontana, R.J.; Davern, T.J.; Lalani, E.; Hynan, L.S.; Reisch, J.S.; Schiodt, F.V.; Ostapowicz, G.; Shakil, A.O.; Lee, W.M. (2005). Acute liver failure study group. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*.

Lawson, J.A.; Farhood, A.; Hopper, R.D.; Bajt, M.L.; Jaeschke, H. (2000). The hepatic inflammatory response after acetaminophen overdose: role of neutrophils. *Toxicol. Sci.* 54, 509–516.

Leite, E.C.; Lunardelli, A.; Castaman, T.A.; Paul, E.L.; Oliveira, J.R. (2007). Extrato aquoso de *Baccharis trimera* (Asteraceae) diminui a inflamação e o dano celular em pleurisia induzida por veneno de *Dirphia* SP. (Saturniidae). *Ver. Bras. Anáç. Clín.* 39, 29-32.

Lehninger A. Princípios da bioquímica. 3ª ed. São Paulo: Sarvier; 2002. Lima, V. (2004). Nota prévia: teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. *Brazilian Journal of Food Technology* 7(2), 187-190.

Levine, R.L.; Williams, J.A.; Stadtman, E.R.; Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology.* 233: 346-357.

Lima G.R. (2006). Proposta de Resolução Específica para Manipulação de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2006. 40 f. Dissertação (Pós-Graduação Especialista em Gestão Pública da Assistência Farmacêutica) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

Lima, V., 2004. Nota prévia: teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. *Brazilian Journal of Food Technology* 7(2), 187-190.

Liu, P.; McGuire, G.M.; Fisher, M.A. (1995). Activation of kupffer cells and neutrophils for reactive oxygen formation is responsible for endotoxin-enhanced liver injury after hepatic ischemia. *Shick.* 3, 56-62.

Liu, Z.X.; Han, D.; Gunawan, B.; Kaplowitz, N. (2006). Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 43, 1220–1230.

Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. (2002). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum 512p.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.

Mangiaterra, P.A. (2005). Evaluación de parâmetros botânicos y fitoquímicos para el control de calidad de carqueja. Buenos Aires, Argentina: Universidade de Belgrano. 43 p.

Marin, D.P.; Bolin, A.P.; Macedo, R.C.S.; Sampaio, S.C.; Otton, R. (2010). ROS production in neutrophils from alloxan-induced diabetic rats treated in vivo with astaxanthin. *International Immunopharmacology* 11, 103-109.

Marklund, S.L.; Holme, E.; Hellner, L. (1982). Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clim Chim Acta* 126, 41-51.

Marques, P.E.; Amaral, S.S.; Pires, D.A.; Nogueira, L.L.; Soriani, F.M.; Lima, B.H.; Lopes, G.A.; Russo, R.C.; Avila, T.V.; Melgaço, J.G.; Oliveira, A.G.; Pinto, M.A.; Lima, C.X.; De Paula, A.M.; Cara, D.C.; Leite, M.F.; Teixeira, M.M.; Menezes, G.B. (2012). Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology* 56, 1971–1982.

Martins, E.R.; Castro, D.M.; Castellani, D.C.; Dias, J.E. (2000). Plantas medicinais. Viçosa: UFV. 220p.

Martins, M.M.R. (2007). Influência da atividade física e do ambiente sobre os níveis de glutatona peroxidase e perfil lipídico em grupo da terceira idade. Dissertação de Mestrado. Novo Hamburgo: Centro Universitário Fevale.

Masella, R.; Di, B.R.; Vari, R.; Filesi, C.; Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J.Nutr.Biochem.* 16, 577-86.

Meguro, M.; Katsuramaki, T.; Kimura, H. (2003). Apoptosis and necrosis after warm ischemia-reperfusion injury of the pig liver and their inhibition by ONO-1714. *Transplantation* 75, 703.

Meotti, F.C.; Rosa, J.M.; Brocardo, P.S.; Balz, D.; Waltrick, A.P.; Bagio, A.; Goulart, E.C. (2006). Protective effect of crude extract from *Wedelia paludosa* (Asteraceae) on the hepatotoxicity induced by paracetamol in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58, 137-142.

Michael, S.L.; Pumford, N.R.; Mayeux, P.R.; Niesman, M.R.; Hinson, J.A. (1999). Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity, the formation of reactive oxygen, nitrogen species. *Hepatology* 30, 186–195.

Mitchell, J.R.; Jollow, D.J.; Potter, W.Z.; Gillette, J.R.; Brodie, B.B. (1973). Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187, 211–217.

Molnar, R.G.; Wang, P.; Ayala, A.; Ganey, P.E.; Roth, R.A.; and Chaudry, I.H. (1997). The role of neutrophils in producing hepatocellular dysfunction during the hyperdynamic stage of sepsis in rats. *J. Surg. Res.* 73, 117–122.

Motta, V.T. (2003). *Bioquímica clínica para o laboratório: Princípios e interpretações*. Editora Médica Missau, Caxias do Sul, p. 419.

Mustafa, U.; Necmettin T.; Hakan, B.; Koray, G.; Omer, G.; Cengiz K. (2001). Nitric Oxide (NO) Metabolism in the cerebrospinal fluid of patients with severe head injury inflammation as a possible cause of elevated no metabolites. *Surg. Neurol.* 56, 350-6.

Nagato, A.C.; Silva, M.A.S.; Trajano, E.T.L., Alves, J.N., Bandeira, A.C.B.; Ferreira, T.A., Valença, S.S.; Bezerra, F.S. (2011). Quantitative and morphological analyses of different types of human liver. *J. Morphol. Sci.* 28 (4), 275-279.

Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, London 6, 173-182.

Neuzil, J.; Stocker, R. (1993). Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *Federation of European Biochemical Societies* 331 (3), 281-284.

Nishimura, F.C.Y.; Almeida, A.C.; Ratti, B.A.; Ueda-Nakamura, T.; Nakamura, C.V.; Ximenes, V.F.; Silva, S.O. (2013). Antioxidant Effects of Quercetin and Naringenin Are Associated with Impaired Neutrophil Microbicidal Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 7 pages.

Nogueira, N.P.A.; Reis, P.A.; Laranja, G.A.T.; Pinto, A.C.; Aiub, C.A.F.; Felzenszwalb, I.; Paes, M.C.; Bastos, F.F.; Bastos, V.L.F.C.; Sabino, C.K.K.; Coelho, M.G.P. (2011). In vitro and in vivo toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 138, 513– 522.

Nordberg, J.; Arnér, E.S.J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine* 31, 1287 – 1312.

Núñez, Hugo (1999). El citocromo p450 y su rol en la hepatotoxicidad inducida por las drogas. *Clínica Vitarte*, Volumen 2 - Número .

Olaleye, M.T.; Akinmoladun, A.C.; Ogunboye, A.A.; Akindahunsi, A.A. (2010). Antioxidant activity and hepatoprotective property of leaf extract of *Boerhaavia diffusa* Linn against acetaminophen-induced liver damage in rats. *Food Chem Toxicol* 48, 2200-2205.

Olaleye, M.T.; Rocha, J.B.T. (2008). Acetaminophen-induced liver damage on mice: effects of some medicinal plants on oxidative defense system. *Exp. Toxicol. Pathol.* 59, 319-327.

Oliveira, C.B.; Comunello, I.N.; Lunardelli, A.; Amaral, R.H.; Pires, M.G.; Silva, G.L.; Manfredini, G.; Vargas, C.R.; Gnoatto, S.C.B.; Oliveira, J.R.; Gosmann, G. (2012). Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. *Molecules* 17, 1113-1123.

Oliveira, C.B.; Comunello, L.N.; Maciel, E.S.; Giubel, S.R.; Bruno, A.N.; Chiela, E.C.F.; Lenz, G.; Gnoatto, S.C.B.; Buffon, A.; Gosmann, G. (2013). The Inhibitory Effects of Phenolic and Terpenoid Compounds from *Baccharis trimera* in Siha Cells: Differences in Their Activity and Mechanism of Action. *Molecules* 18, 11022-11032.

Oliveira, E.J.; Gontijo, S.V.; Maluf, W.R. (1999). Cultive carqueja em sua horta. Boletim técnico de hortaliças N° 0271 edição. Universidade Federal de Lavras. Departamento de Agricultura. Disponível em <http://www2.ufla.br>. Acesso em 20 de agosto de 2002.

Oliveira-Lima, A.; Dias da Silva, W. (1970). *Imunologia, imunopatologia, alergiamétodos*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 236 p.

Oliveira, R.N.; Rehder, V.L.G.; Oliveira, A.S.S.; Júnior, I.M.; Carvalho, J.E.; Ruiz, A.L.T.G.; Jeraldo, V.L.S.; Linhares, A.X.; Allegretti, S.M. (2012). *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. *Experimental Parasitology* 132, 135–143

Ostapowicz, G.; Fontana, R.J.; Schodt, F.V.; Larson, A.; Davern, T.J.; Han, S.H.; McCashland, T.M.; Shakil, A.O.; Hay, J.E.; Hynan, L.; Crippin, J.S.; Blei, A.T.; Samuel, G.; Reisch, J.; Lee, W.M. (2002). Acute liver failure study group. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med*.

Pádua, B.C.; Silva L.D.; Rossoni Junior, J.V.; Humberto, J.L.; Chaves, M.M.; Silva, M.E.; Pedrosa, M.L.; Costa, D.C. (2010). Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. *Journal of Ethnopharmacology* 129, 381–386.

Paiva, S.; Russell, R. (1999) Beta carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr.* 18, 426–33.

Park, B.K.; Kitteringham, N.R.; Maggs, J.L.; Pirmohamed, M.; Williams, D.P. (2005). The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 177–202.

Pastore, A.; Federici, G.; Bertini, E.; Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 333, 19–39.

Patrizia, P.; Giuseppina, A.; Stefania, M.; Marisa, M.; Rokia, S.; Rita, P.A. (2005). Anti-inflammatory activity of Verminoside from *Kigelia africana* and evaluation of cutaneous irritation in cell cultures and reconstituted human epidermis. *J. Nat. Prod.* 68, 1610–1614.

Perry, G.; Raina, A.K.; Nunomura, A.; Wataya, T.; Sayre, L.M.; Smith, M.A. (2000). How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 831–834.

Petronilho, S.; Maraschin, M.; Coimbra, M.A.; Rocha, S.M. (2012). In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Industrial Crops and Products* 40, 1-12.

Poolman, T.M.; Ng, L.L.; Farmer, P.B. et al. (2005). Inhibition of the respiratory burst by resveratrol in human monocytes: correlation with inhibition of PI3K signaling. *Free Radic Biol Med* 39, 118–132.

Prescott, L.F. (1980). Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 10, 291S–298S.

Proceedings of the FDA NDAC meeting, Introduction by Charles E. Ganley, MD www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/cder02.htm#NonprescriptionDrugs. Accessed: April 15, 2004

Pryor, W.A. (1991). The antioxidant nutrient and disease prevention: What do we know and what do we need to find out? *Amer J Clin Nutri.* 53, 391-393.

Rahman I. (1999). Inflammation and the regulation of glutathione level in lung epithelial cells. *Antioxid.Redox.Signal.* 1, 425-47.

Rahman, I.; Biswas, S.K.; Kirkham, P.A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem. Pharmacol., Oxford* 72, 1439-1452.

Reid, A.B.; Kurten, R.C.; McCullough, S.S.; Brock, R.W.; Hinson, J.A. (2005). Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 312, 509–516.

Rodrigues, C.R.F.; Dias, J.H.; Mello, R.N.; Richter, M.F.; Picada, J.N.; Ferraz, A.B.F. (2009). Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 125 (1), 97-101.

Rojkind, M.; Dominguez-Rosales, J.; Nieto, N.; Greenwel, P. (2002). Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell Mol Life Sci* 59 (11), 1872-1891.

Roušar, T.; Pařík, P.; Kučera, O.; Bartoš, M.; Cervinková, Z. (2009). Glutathione reductase is inhibited by acetaminophen-glutathione conjugate in vitro. *Physiol Res.* 58, 239-246.

Sadi, G.; Yilmaz, O.; & Guray T. (2008). Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. *Mol.Cell Biochem.* 309, 109-16.

Sanrisil. (2001) Extrato Seco de Carqueja. Disponível em: <<http://www.sanrisil.com.br/brprodcarqueja.htm>>. Capturado em: 04/junho/2001.

Sarkadi, B. et al. (2006). Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiological Reviews* 86, 1179-1236.

Satiago, F.B.; Gómez Gallego (2002). Polimorfismo de citocromo P450;Papel como marcadoe biológico.Medicina Del trabalho,11,3,mayo-junio.

Sidhartha, D.R.; Nirav Patel, N.S.; Akila Nagori, A.N.; Sidney, J.S. (2006). Pre-exposure to a novel nutritional mixture containing a series of phytochemicals prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell deaths by enhancing BCL-XL expression and minimizing oxidative stress in the liver. *Mol Cell Biochem* 11.

Sies, H. (1985). *Oxidative stress:introductory remarks*. London: Academic Press.

Sies, H. (1986). *Biochemistry of Oxidative Stress*. *Angewandte Chemie International Edition in English* 25, 1058-71.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. Review. *Eur. J. Biochem.* 215(2), 213-219.

Silva, F.G.; Oliveira, C.B.A.; Pinto, J.E.B.P.; Nascimento, V.E.; Santos, S.C.; Seraphin, J.C.; Ferri, P.H. (2007). Seasonal Variability in the Essential Oils of Wild and Cultivated *Baccharis trimera*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18, 990–997.

Simões-Pires, C.A.; Debenedetti, S.; Spegazzini, E.; Mentz, L.A.; Matzenbacher, N.I.; Limberger, R.P.; Henriques, A.T. (2005). Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to section Caulopterae (*Asteraceae*, *Astereae*): a taxonomic approach. *Plant Systematics and Evolution* 253, 23–32.

Slattery, J.T.; and Levy, G. (1979). Acetaminophen kinetics in acutely poisoned patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 25, 184–195.

Smith, G.S.; Nadig, D.E.; Kokoska, E.R.; Solomon, H.; Tiniakos, D.G.; Miller, T.A. (1998). Role of neutrophils in hepatotoxicity induced by oral acetaminophen administration in rats. *J. Surg. Res.* 80, 252–258.

Soicke, H.; Leng-Peschlow, E. (1987). Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. *Planta Medica* 53, 37-39.

Surh, Y.J. (2008). NF-kappa B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17(1), 269-72.

Tauber, A.I.; Fay, J.R.; Marletta M.A. (1984). Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochem Pharmacol* 33, 1367–1369.

- Thonson, A.W.; Knolle, P.A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Immunology*.
- Tseng, T.H.; Kao, E.S.; Chu, C.Y.; Chou, F.P.; Lin Wu, H.W.; Wang, C.J. (1997). Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 35, 1159–64.
- Verdi, L.G.; Brighent, I.M.C.; Pizzolatti, M.G. (2005). Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova* 28(1), 85-94.
- Vichnewski, W. (1990). Análises fitoquímicas de extratos alcoólicos de Asteraceae, *Baccharis trimera*, *Calea teucrifolia*, *Eremanthus eleagnus* e *Vernonia fruticulosa*, 1990. Encontro regional de química. Resumos São Carlos, 1890.
- Villa, R.D.; Nogueira, R.F.P. (2005). O uso de reações de fenton na remediação de solo contaminado com p, p' DDT. *Eclética Química* 30 (2), 69-75.
- Vinolo, M.A.R.; Hatanaka, E.; Lambertucci, R.H.; Newsholme, P.; Curi, R. (2009). Effects of short chain fatty acids on effector mechanisms of neutrophils. *Cell Biochem Funct.* 27, 48–55.
- Weber, R.L.M.; Termignoni, R.R.; Porto, M.L. (2005). Comportamento in vitro de *Baccharis trimera* (carqueja) em diferentes níveis de sobrecarga por cobre. XIII São iniciação científica. Ciências Biológicas. Universidade Federal de Rio Grande do Sul, p.
- Williams, C.D.; Bajt, M.L.; Sharpe, M.R.; McGill, M.R.; Farhood, A.; Jaeschke, H. (2014). Neutrophil activation during acetaminophen hepatotoxicity and repair in mice and humans. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1-12.
- Winterbourn, C.C.; Kettle, A.J. (2003). Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 305, 729-736.
- Xiong, Q.; Xie, P.; Li, H.; Hao, L.; Li, G.; Qiu, T.; Liu, Y. (2010). Acute Effects Of Microcystins Exposure On The Transcription Of Antioxidant Enzyme Genes In Three Organs (Liver, Kidney, And Testis) Of Male Wistar Rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 24, 361–367.
- Yanagisawa, T.; Maemura, S.; Sasaki, H.; Endo, T.; Okada, M.; East, P.W.; Virgo, D.M.; Creasy, D.M. (1998). Subacute and chronic toxicity studies of tryethylenetetramine dihydrochloride (TJA-250) by oral administration to F-344 rats. *J Toxicol Sci* 42, 619.
- Yen, F.L.; Wu, T.H.; Lin, L.T.; Lin, C.C. (2007). Hepatoprotective and antioxidant effects of *Cuscuta chinensis* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 123-128.
- Yen, F.L.; Wua, T.H.; Lin, L.T.; Cham, T.M.; Lin, C.C. (2008). Nanoparticles formulation of *Cuscuta chinensis* prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology* 46, 1771–1777.

Yuan, R.; Lin, Y. (2000). Traditional Chinese medicine: na approach to scientific proof and chinal validation. *Pharmacology and Therapeutics* 86, 191-198.

Zalba, G.; San Jose, G.; Moreno, M.U.; Fortuno, M.A.; Fortuno, A.; Beaumont, F.J. (2001). Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 38 (6), 1395-1399.

Zieliska-Przyjemska, M.; Olejnik, A.; Dobrowolska-Zachwieja, A.; Grajek, W. (2009). In vitro Effects of Beetroot Juice and Chips on Oxidative Metabolism and Apoptosis in Neutrophils from Obese Individuals. *Phytotherapy Research*, 23, 49–55.

Zheng, W.; Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agricultural and Food* 49, 5165-5170.

Capítulo 9- Anexos

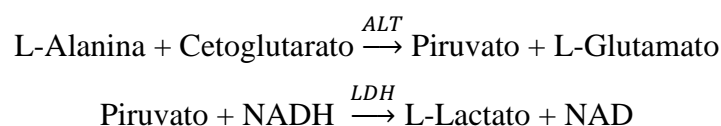
9- ANEXOS

Anexo I – Protocolos das Dosagens Bioquímicas

1.1 - Alanina Aminotransferase

Princípio

A ALT catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A conseqüente redução da absorvância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.



Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8 °C e por 2 semanas a 10 °C negativos.

Produto Utilizado

ALT/GPT Liquiform, Catálogo 74-4/30 - ANVISA - 10009010029

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente de Trabalho: O conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 - 25 °C e 14 dias entre 2 – 8°C. Contém tampão 80 mmol/L, pH 7,8, L-Alanina 500 mmol/L, 2-cetoglutarato 15 mmol/L, NADH 180

Equipamentos

1. Fotômetro com cubeta termostatizada a 37 °C capaz de medir a absorvância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostaticada a 37°C com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do Reagente de Trabalho.
2. Homogeneizar.
3. Transferir para a cubeta termostaticada a 37 °C.
4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

Cálculos

Calcular a média das diferenças de absorvância por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$) e utilizar para calcular o resultado.

ALT/GPT (U/L) 340 nm = $\Delta A/\text{minuto} \times 1746$

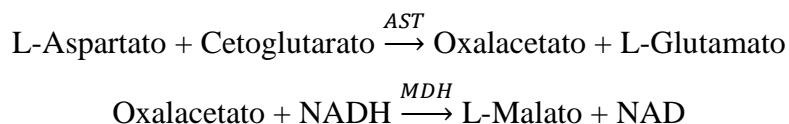
Conversão: Unidades Convencionais (U/L) $\times 16,7$ = Unidades SI (nkat/L).

1.2 - Aspartato Aminotransferase

Princípio

A AST catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD.

A conseqüente redução da absorvância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.



Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8°C e por 2 semanas a 10°C negativos.

Produto Utilizado

AST/GOT Liquiform, Catálogo 75-4/30 - ANVISA - 10009010018

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente de Trabalho: o conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 – 25°C e por 14 dias entre 2 – 8°C; Contém tampão 80 mmol/L, pH 7,8, L-Aspartato 240 mmol/L, 2-cetoglutarato 12 mmol/L, NADH 180 µmol/L, LDH ≥900 U/L, MDH ≥600 U/L e azida sódica 14,6 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro com cubeta termostaticada a 37 °C capaz de medir a absorvância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostaticada a 37°C com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do reagente de trabalho.
2. Homogeneizar.
3. Transferir para a cubeta termostaticada a 37 °C.
4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

Cálculos

Calcular a média das diferenças de absorvância por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$) e utilizar para calcular o resultado.

AST/GOT (U/L) 340 nm = $\Delta A/\text{minuto} \times 1746$

Conversão: Unidades Convencionais (U/L) $\times 16,7$ = Unidades SI (nkat/L).

Anexo II – Trabalho publicado

- Trabalho publicado na revista *Current Pharmaceutical Biotechnology*.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Current Pharmaceutical Biotechnology, 2013, 14, 000-000

1

***Baccharis trimera* Improves the Antioxidant Defense System and Inhibits iNOS and NADPH Oxidase Expression in a Rat Model of Inflammation**

Bruno da Cruz Pádua^{a,b}, Joamyr Victor Rossoni Júnior^a, Cíntia Lopes de Brito Magalhães^{a,e}, Janaina Brandão Seiber^f, Carolina Morais Araújo^a, Gustavo Henrique Bianco de Souza^f, Míriam Martins Chaves^c, Marcelo Eustáquio Silva^{a,d}, Maria Lucia Pedrosa^{a,e} and Daniela Caldeira Costa^{a,e*}

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas – NUPEB; Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, 35.400-000, Brasil; ^bCentro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG), Curvelo, MG, 35.790-970, Brasil; ^cDepartamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Cx. Postal 486, Belo Horizonte, MG, 30.161-970, Brasil; ^dDepartamento de Alimentos; Escola de Nutrição; Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, 35.400-000, Brasil; ^eDepartamento de Ciências Biológicas (DECBI), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas; Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, 35.400-000, Brasil; ^fPrograma de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – CIPHARMA, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, 35.400-000, Brasil

Anexo III – Trabalho submetido à publicação

➤ Trabalho submetido à publicação no *European Journal of Medicinal Chemistry*

● **European Journal of Medicinal Chemistry**

13 de Mar 1

Para Eu

Ms. Ref. No.: EJMECH-D-14-00519

Title: Protective effect of Baccharis trimera extract on acute hepatic injury induced by acetaminophen in rats
European Journal of Medicinal Chemistry

Dear Ms. Padua,

Your submission, referenced above, has been assigned the manuscript number EJMECH-D-14-00519 and has been assigned to an Editor who will handle peer review.

Please note that in most cases at least two reviews may be required before a decision on a manuscript is made. You will be notified by e-mail each time a reviewer agrees to review your manuscript.

To track the progress of your manuscript, please log in to <http://ees.elsevier.com/ejmech/> and click on the "Submissions Being Processed" folder.

Your username is: brunobioufop@yahoo.com.br

Thank you for submitting your manuscript to European Journal of Medicinal Chemistry.

Kind regards,

Anexo IV – Resumos publicados em anais de congressos

PÁDUA, B.C.; ROSSONI JUNIOR, J.V.; SILVA, L.S.; MIRANDA, A.M.; ARAUJO, G.R.; de Brito Magalhães, C.L.; CHAVES, M.M.; Silva, M.E.; Pedrosa, M. L.; COSTA, D.C. *Baccharis trimera* modula a produção de óxido nítrico em neutrófilos via regulação da enzima óxido nítrico sintase. In: VII Reunião Regional da Federação de Sociedade de Biologia Experimental - FeSBE, 2013, Guarapari. VIII Reunião Regional da Federação de Sociedade de Biologia Experimental - FeSBE, 2013.

PÁDUA, B.C.; ROSSONI JUNIOR, J.V.; de Brito Magalhães, C.L.; Silva, M.E.; CHAVES, M.M.; Pedrosa, M.L.; COSTA, D.C. Free Radical Scavenging Potential of *Baccharis trimera*. In: XLI Annual Meet of SBBq, 2012, Foz do Iguaçu. XLI Annual Meet of SBBq, 2012.

PÁDUA, B.C.; ROSSONI JUNIOR, J.V.; SILVA, L.S.; MIRANDA, A.M.; ARAUJO, G.R.; de Brito Magalhães, C.L.; Silva, M.E.; Pedrosa, M.L.; COSTA, D.C. *Baccharis trimera* modula a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos via regulação da enzima NADPH oxidase. In: VII Reunião Regional da Federação de Sociedade de Biologia Experimental - FeSBE., 2012, Maceió. VII Reunião Regional da Federação de Sociedade de Biologia Experimental - FeSBE., 2012.

PÁDUA, B.C.; ROSSONI JUNIOR, J.V.; Silva, M.E.; CHAVES, M.M.; Pedrosa, M. L.; COSTA, D.C. Antioxidant effect of *Baccharis trimera* hidroalcoholic extract on the parameters of oxidative stress. In: XL Annual Meet of SBBq, 2011, Foz do Iguaçu. XL Annual Meet of SBBq, 2011.