

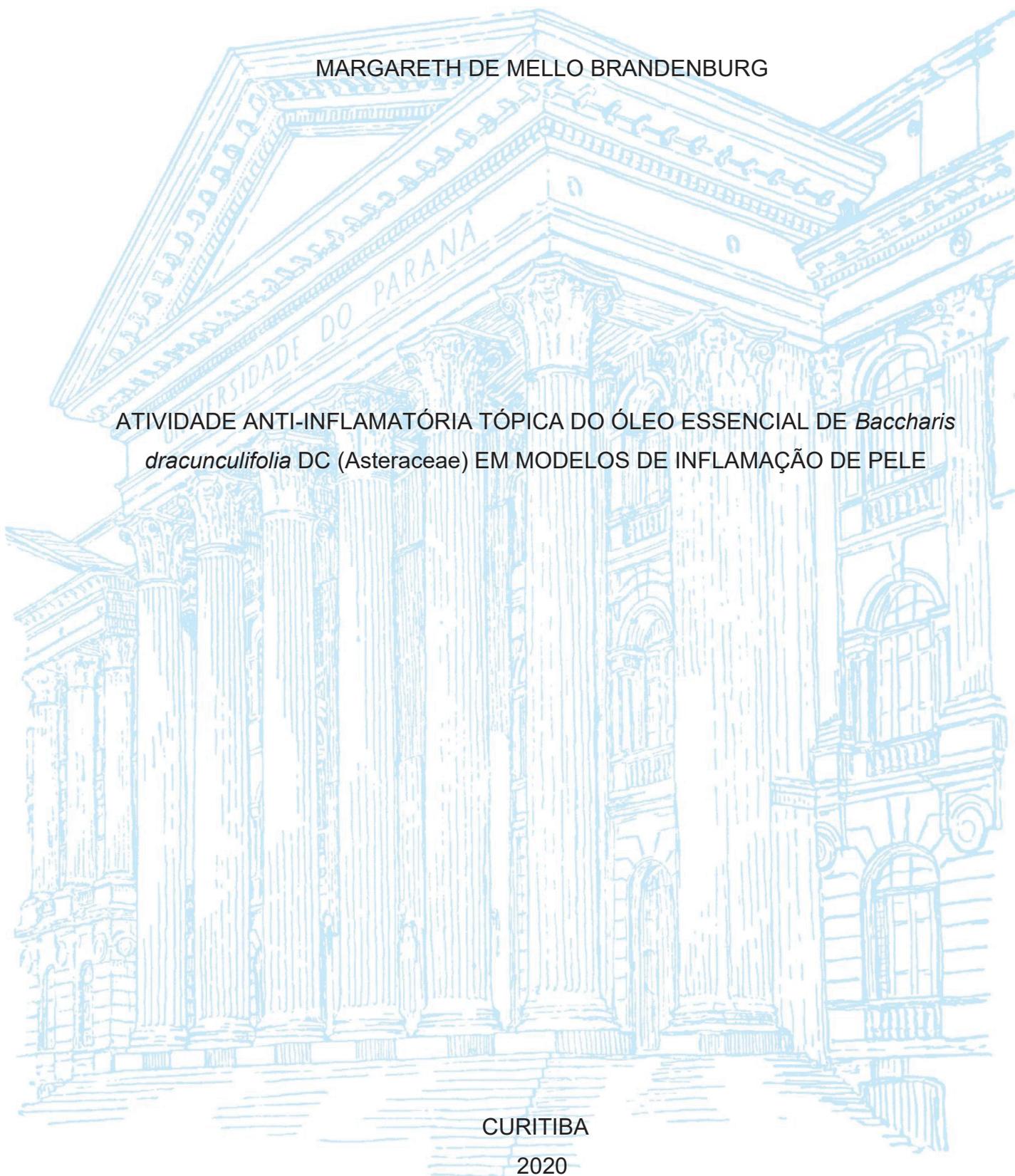
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARGARETH DE MELLO BRANDENBURG

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO DE PELE

CURITIBA

2020



MARGARETH DE MELLO BRANDENBURG

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO DE PELE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Almeida Cabrini

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1408)

Brandenburg, Margareth de Mello

Atividade anti-inflamatória tópica do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) em modelos de inflamação de pele. / Margareth de Mello Brandenburg. – Curitiba, 2020.
150 p.: il.

Orientador: Michel Fleith Otuki

Coorientadora: Daniela Almeida Cabrini

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Dermatite 2. Inflamação 3. Edema 4. Psoríase I. Título II. Otuki, Michel Fleith III. Cabrini, Daniela de Almeida, 1970- IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 616.51



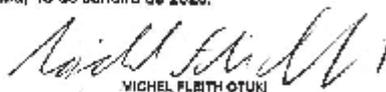
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
4007-01603890

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MARGARETH DE MELLO BRANDENBURG**, intitulada: **ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA DC (ASTERACEAE) EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO DE PELE**, sob orientação do Prof. Dr. MICHEL FLEITH OTUKI, após terem lido a mesma e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 13 de Janeiro de 2020.


MICHEL FLEITH OTUKI
Presidente da Banca Examinadora


ELIZABETH SOARES FERNANDES
Avaliador Externo (INSTITUTO PÉLE FÉLIX DO PRÍNCIPE)


DANIEL AUGUSTO CADORIN BUENO MENDES
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico essa dissertação à minha mãe, Dulce, por ser minha melhor amiga, por sempre me esperar com um abraço repleto de amor, e por mesmo na distância ser a luz que me guiou me trazendo afeto e carinho. Obrigada mãe, por sempre acreditar em mim, por ser minha super-heroína, minha inspiração e meu maior exemplo de força. Você é minha maior estrela.

Dedico essa dissertação ao meu amado, Maycon, que com sua enorme paciência e carinho percorreu cada passo desse mestrado junto comigo, por me apoiar e acalmar minha alma nos dias difíceis. Obrigada amor, por ser essa pessoa incrível e por compartilhar os sonhos e a vida comigo.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por existir em minha companhia em todos os segundos. Por me dar saúde para lutar pelos meus sonhos e amor para enxergar o lado bom da vida e das pessoas. Obrigada por me permitir te enxergar em tudo aquilo que é belo.

À minha família...Mãe, Maycon, Ray, vocês são meu alicerce, minha morada e o motivo principal da minha alegria! Aos meus irmãos Silvio e Diogo que são parte de mim, um prolongamento da minha vida e meu coração fora do peito, sei que nunca estarei só, pois tenho vocês. Aos queridos Lúcio, Simone, Jonathan e Dani.

Aos meus orientadores **Daniela e Michel**, por terem me aceitado em seu laboratório sem me conhecerem. Obrigada pela confiança e ensinamentos

A todos os integrantes do LAFFPEL e meus amigos: **Juliana Ferreira e Fernando Zonzini**, pelas palavras de calma e apoio prestados, pela parceria e amizade, obrigada por sempre me trazerem luz! Também a **Bruna, Anita, Kelly, Andressa, Angélica, Thalita, Kauê**...Vocês foram essenciais e tornaram minha caminhada mais feliz. Em especial à **Fernanda Grillo**, minha grila falante, que além de amiga foi muito importante na realização de cada passo desse projeto, estando comigo em todos os momentos, compartilhando as alegrias, novos resultados, dificuldades e acima de tudo as gargalhadas. Só nós sabemos tudo que passamos... Obrigada pela ajuda incansável, pela companhia e acima de tudo, pela amizade!

A meu anjo da guarda e uma das pessoas mais especiais que já conheci: **Priscila Pawloski**, por ter me ensinado muito do que aprendi no Lab, por ser uma amiga fiel e que em todos os momentos trouxe alegria e paz. Por segurar a minha mão e por ter sido a primeira a sorrir pra mim aqui. Eu sei que Deus às vezes nos coloca em frente a grandes provações, mas no decorrer do nosso caminho ele também coloca as pessoas que vão nos ajudar a superar tudo, e você foi uma dessas pessoas para mim Pity. Me faltam palavras pra poder te agradecer pelas horas e horas em que dividimos sorrisos, ideias e alegrias! Muito obrigada por tudo!

Ao PPG Farmaco, pelos corais de natal e momentos vividos. Em especial às profs. **Eunice André e Maria Fernanda**, por quem eu tenho um carinho enorme e especial.

A Universidade Federal do Paraná, aos funcionários do Biotério/BL e todos os animais tornaram esse projeto possível. As agências de fomento e aos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho: **meu mais sincero Obrigada!**

No matter how big the idea, or how vast the project, everything starts the same way - with one small moment.

Shakira

RESUMO

Baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae) é uma planta que possui relevância etnofarmacológica considerável, sendo comumente utilizada na medicina tradicional e conhecida por nomes populares como “vassourinha” ou “alecrim do campo”. Possui diferentes usos terapêuticos pela população, sendo utilizado como imunestimulante, antibiótico e anti-inflamatório. Porém, apenas alguns estudos na literatura demonstram indícios de seu potencial anti-inflamatório, e ainda, nenhum trabalho anterior a este investigou a eficácia da aplicação tópica de seu óleo essencial. Visto isso, o objetivo desse estudo foi a avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* (OEBd) em modelos de inflamação em pele de camundongos. Foram avaliados parâmetros como o potencial anti-edematogênico do óleo e atividade de inibição de migração celular frente a modelos de inflamação induzidos por ácido araquidônico, TPA agudo e crônico. No modelo crônico de inflamação de pele, adicionalmente, foram avaliados parâmetros de proliferação e diferenciação epidermal, importantes características em doenças de pele, como a psoríase. Além disso, investigou-se um possível perfil de segurança e mecanismo de ação associado ao óleo essencial da planta. Como resultado obtivemos que a aplicação tópica de OEBd foi capaz de reduzir a formação do edema de orelha induzido por Ácido Araquidônico e TPA em modelo agudo e crônico, reduzindo também o influxo celular para o tecido inflamado, como visto pela menor presença das enzimas MPO e NAG. Ademais, a aplicação tópica de OEBd foi capaz de reduzir a hiperproliferação e alterou a diferenciação de queratinócitos na epiderme em modelo crônico de inflamação de pele. Quando comparado com a dexametasona o OEBd demonstrou não interferir no peso de órgãos linfoides sistêmicos, mesmo apesar do fato de seu efeito ter sido revertido pelo antagonista de receptores glicocorticoides (mifepristona). O presente estudo traz novas evidências sobre a ação anti-inflamatória do OEBd quando aplicado por via tópica, sugerindo dessa forma, que o OEBd pode representar uma nova ferramenta para o tratamento de doenças inflamatórias de pele.

Palavras-chave: Dermatites; Inflamação; Edema; *B. dracunculifolia*; Psoríase.

ABSTRACT

Baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae) is an ethnopharmacological relevant plant commonly used in traditional medicine. Known as “vassourinha” or “alecrim do campo”, has several different therapeutic uses reported, such as immunostimulant, antibiotic and anti-inflammatory. However, only a handful of studies has shown its anti-inflammatory potential and no reports of its topical anti-inflammatory efficacy exist. Even more so for the plant’s essential oil. Therefore, the aim of this study was the evaluation of the anti-inflammatory activity of *Baccharis dracunculifolia* essential oil (OEBd) in models of skin inflammation in mice. We evaluated the essential oil’s anti-edematogenic potential and inhibitory activity over cell migration after challenges with Arachidonic Acid and TPA (acute and chronic). On the chronic TPA model we also evaluated parameters of epidermal differentiation and proliferation as models for important characteristics present in skin diseases such as psoriasis. Furthermore, we briefly investigated the safety profile and mechanism of action of OEBd. The results obtained showed that topical application of OEBd reduced edema formation in both arachidonic Acid, acute and chronic TPA models. It also reduced cell influx into the tissue by detected with enzymatic activity of MPO and NAG. Also, topical application of OEBd reduced hyperproliferation and altered keratinocytes differentiation at the epidermis in the chronic skin inflammation model. Compared to dexamethasone, OEBd did not interfere with lymphoid organs weight, although at least part of the effects seen are due to a glucocorticoid -dependent mechanism, as seen in the mifepristone assay. Altogether the current study brings new evidence for the anti-inflammatory activity of essential oil obtained from *Baccharis dracunculifolia* when used as a topical agent. This suggests that OEBd might be a new tool for treating skin diseases.

Keywords: Dermatitis; Inflammation; Edema; *B. dracunculifolia*; Psoriasis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição mundial da família Asteraceae.	17
FIGURA 2 – Folhas de <i>B. dracunculifolia</i> coletadas na cidade de Santa Helena, Paraná, Brasil.....	19
FIGURA 3 – As camadas da pele.	24
FIGURA 4 – Células do sistema imune da pele.	25
FIGURA 5 – Aparelhos utilizados na extração do óleo essencial.....	38
FIGURA 6 – Representação esquemática do modelo de dermatite induzida por TPA.	40
FIGURA 7 – Representação esquemática do modelo de dermatite induzida por AA	41
FIGURA 8 – Representação esquemática do experimento crônico induzido por múltiplas aplicações de TPA	42
FIGURA 9 – Representação esquemática do experimento crônico para avaliação da segurança da aplicação de <i>OEBd</i>	43
FIGURA 10 – Representação esquemática do experimento crônico para avaliação de um possível mecanismo de ação do <i>OEBd</i>	43
FIGURA 11 – Caracterização dos compostos isolados do <i>OEBd</i> , por extração através de CGMS.....	49
FIGURA 12 – Efeito antiedematogênico do <i>OEBd</i> em modelo de inflamação aguda induzida por TPA.....	51
FIGURA 13 – Efeito do <i>OEBd</i> sobre a enzima MPO e sobre a migração celular em modelo de dermatite aguda induzida por TPA.	53
FIGURA 14 - O tratamento tópico com <i>OEBd</i> . causa inibição do edema causado pelo AA	54
FIGURA 15 –Efeito de inibição da atividade edematogênica do TPA pelo tratamento crônico com <i>OEBd</i>	55
FIGURA 16 O tratamento com <i>OEBd</i> inibe atividade enzimática de MPO e NAG induzidas pelo tratamento repetido com TPA.....	56
FIGURA 17 –Efeito do <i>OEBd</i> sobre a migração celular e espessura da epiderme analisados por histologia no modelo de aplicações repetidas de TPA.	58
FIGURA 18 –Efeito do <i>OEBd</i> na proliferação de queratinócitos através de marcação imunohistoquímica para PCNA	60

FIGURA 19 –Efeito do <i>OEBd</i> na diferenciação de queratinócitos através de marcação imunohistoquímica para CK-14.	62
FIGURA 20 – Efeito antiedematogênico sistêmico do <i>OEBd</i> quando aplicado por via tópica.	63
FIGURA 21 – Efeito da aplicação tópica repetida do <i>OEBd</i> sobre a pele e órgãos linfoides.	64
FIGURA 22 – Fotos representativas dos órgãos linfoides dos animais tratados repetidamente com <i>OEBd</i> ou Dexametasona.	65
FIGURA 23 – Evidência para um possível mecanismo de ação do <i>OEBd</i>	66
FIGURA 24 – Influência do antagonista de glicocorticoide no efeito inibitório do <i>OEBd</i> sobre infiltração de neutrófilos.	67
FIGURA 25 – Via de sinalização do TPA e do AA na pele.....	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Drogas e doses utilizadas no estudo	37
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

<i>B. dracunculifolia</i>	- <i>Baccharis dracunculifolia</i>
OEBd	- Óleo essencial de <i>Baccharis dracunculifolia</i>
TPA	- 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
IL-6	- Interleucina 6
IL-10	- Interleucina 10
DEXA	- Dexametasona
AA	- Ácido araquidônico
INDO	- Indometacina
PEG 400	- Polietilenoglicol 400
NAG	- N-acetil- β -D-glicosaminidase
MPO	- Mieloperoxidase
HTAB	- Brometo de hexadeciltrimetilamônio
TMB:	- Tetrametilbenzidina
PBS	- Tampão fosfato
H&E	- Hematoxilina e Eosina
DAB	- Diaminobenzidina
N2SO4	- Sulfato de nitrogênio
ARRIVE	- Animal Research: Reporting In Vivo Experiments
RU486	- Mifepristona
ALFAC	- Solução de Álcool, Formalina e Ácido Acético
BSA	- Albumina sérica bovina
ANOVA	- Análise de variância
PCNA	- Antígeno Nuclear de Células em Proliferação
COX	- Cicloxigenase
LOX	- Lipoxigenase
PLA2	- Fosfolipase A2
PKC	- Proteína Quinase C
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
IL-1 β	- Interleucina-1-beta
LT	- Linfócito T
LTB4	- Leucotrieno B4

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 ASTERACEAE E GÊNERO <i>BACCHARIS</i>	17
1.2 <i>BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA</i> (ASTERACEAE), A FONTE DE PRÓPOLIS VERDE	18
1.3 O PROCESSO INFLAMATÓRIO NA PELE	21
1.4 DOENÇAS DERMATOLÓGICAS.....	28
1.5 FARMACOTERAPIA E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS EM DOENÇAS DE PELE	29
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	35
3.1.1 Objetivo geral	35
3.1.2 Objetivos específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 DROGAS.....	37
4.2 REAGENTES	37
4.3 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	37
4.4 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	38
4.5 ANIMAIS.....	39
4.6 EXPERIMENTO 1: MODELOS EXPERIMENTAIS DE DERMATITE AGUDA ...	39
4.7 EXPERIMENTO 2: INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE PELE INDUZIDA POR MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA	41
4.8 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ÓLEO ESSENCIAL DE <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> E DE EFEITO TIPO CORTICOIDE.	42
4.9 ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO) E N-ACETIL- β -D-GLICOSAMINIDASE (NAG)	44
4.10 ANÁLISE DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	44
4.11 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA ANTIGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA).	45
4.12 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA CITOQUERATINA 14 (CK-14).....	45
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5 RESULTADOS	48

5.1 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA	48
5.1 EFEITO ANTIEDEMATOGÊNICO DO OE <i>BD</i> TÓPICO NA DERMATITE IRRITATIVA INDUZIDA POR TPA.....	50
5.1 EFEITO DO OE <i>BD</i> TÓPICO SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR NA DERMATITE IRRITATIVA INDUZIDA POR TPA.....	52
5.2 EFEITO TÓPICO DO OE <i>BD</i> DERMATITE INDUZIDA POR AA	54
5.3 AÇÃO DO OE <i>BD</i> NO MODELO DE HIPERPROLIFERAÇÃO CAUSADA POR MÚLTIPLAS APLICAÇÕES DE TPA.....	54
5.1 EFEITO DO OE <i>BD</i> SOBRE A DIFERENCIAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE QUERATINÓCITOS INDUZIDOS PELA APLICAÇÃO REPETIDA DE TPA	59
5.2 INVESTIGAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO TIPO CORTICOIDE DO OE <i>BD</i>	63
5.3 INFLUÊNCIA DO OE <i>BD</i> NA AÇÃO DOS GLICOCORTICOIDES.....	66
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS.....	81

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASTERACEAE E GÊNERO *Baccharis*

A família Asteraceae é um grupo bastante numeroso dentro das angiospermas, possuindo em torno de 23 mil espécies, sendo que a América do sul apresenta maior quantidade de espécies, seguida pelo continente asiático (Figura 1). Possuem aspectos variados, tendo como representantes da família desde pequenas ervas até arbustos com mais de 3 metros de altura (SFORCIN et al., 2012).

Sabe-se que essa família apresenta algumas espécies que possuem compostos tóxicos ou extremamente amargos e que por isso conferem a elas proteção contra herbivoria, uma das razões pela qual a família apresenta grande ocorrência mundial proliferando-se vastamente. Além disso, também é demonstrado que a presença de frutanos do tipo inulina (polímeros aquosos de frutose) estão associados com a habilidade dessas plantas em adaptar-se a diferentes condições climáticas (LIVINGSTON; HINCHA; HEYER, 2009).

Em um aspecto fitoquímico, tal grupo destaca-se por uma diversidade de metabólitos secundários, dentre eles, principalmente os terpenos e flavonoides, conhecidos amplamente por suas capacidades bioativas (SFORCIN et al., 2012).

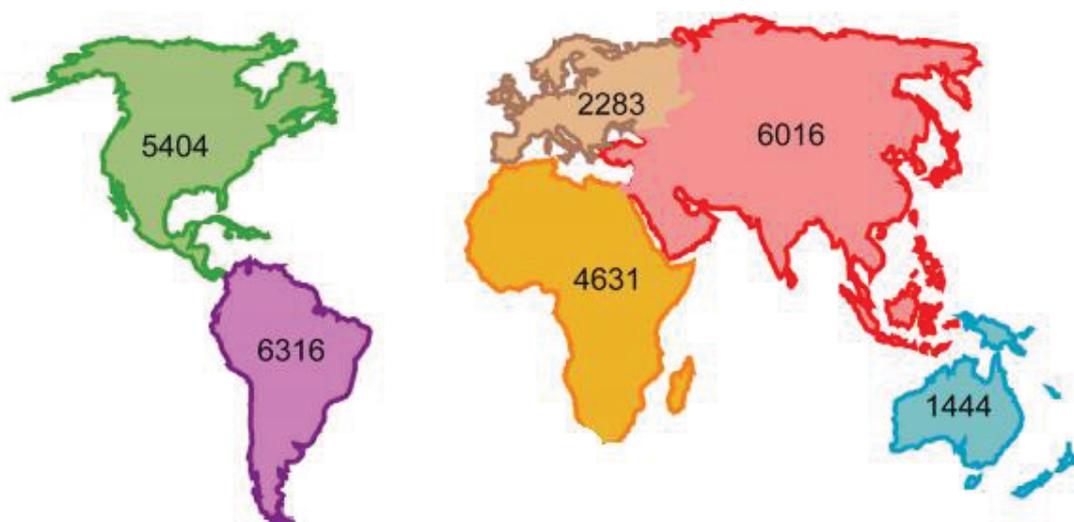


FIGURA 1 – Distribuição mundial da família Asteraceae.

Os números representam a quantidade de espécies pertencentes a família em cada continente.

Fonte: (PANERO; CROZIER, 2016).

O gênero *Baccharis*, pertencente a esta diversa família também ocorre em grande concentração no Brasil, em sua maioria, no Sudoeste do país, onde acredita-se ser proveniente seu táxon (GOMES; FERNANDES, 2002). Este gênero compreende mais de 500 espécies descritas na literatura, dentre as quais 120 parecem ocorrer no Brasil, com morfologias complexas que variam em aplicabilidades como combate à erosão do solo, algumas outras consideradas plantas invasoras ou ervas daninhas, que podem, como consequência, levar um gado à morte com uma dose letal baixíssima (entre 0,25 a 0,50 g) da espécie ingerida. Ainda, existem as espécies com aplicabilidades ornamentais que são cultivadas por sua beleza, além de outras com usos relatados na medicina tradicional (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; RAMOS CAMPOS et al., 2016).

Dentre elas, algumas espécies já foram descritas na literatura por suas ações benéficas em diversas comorbidades. *B. trimera* conhecida popularmente como “carqueja” aparenta ter efeitos protetivos contra o diabetes, demonstrando uma melhora no perfil glicêmico e função pancreática de ratos diabéticos, em um modelo experimental de diabetes induzida por aloxana (DO NASCIMENTO KAUT et al., 2018). O potencial terapêutico dessa espécie também já foi testado em um modelo não clínico de doença cardiovascular, onde a diabetes foi induzida por aplicação de estreptozotocina em ratos expostos ao cigarro e a ração enriquecida com altos níveis de colesterol por 4 semanas. Durante o estudo, diversos parâmetros foram testados e o tratamento com *B. trimera* reverteu alterações lipídicas plasmáticas, danos renais e de estresse oxidativo (SOUZA et al., 2019).

Além disso, em relação a atividade anti-inflamatória exercida por espécies de *Baccharis*, sabe-se que a *B. uncinella* aparenta ser eficaz em modelo de edema de pata induzida por carragenina e por PLA2 (ZALEWSKI et al., 2011). Assim como *B. medulosa* e *B. rufescens* quando administradas via intraperitoneal aparentam reverter o edema induzido por carragenina 5h após a injeção do composto na pata de camundongos.

1.2 *Baccharis dracunculifolia* (ASTERACEAE), A FONTE DE PRÓPOLIS VERDE

A *Baccharis dracunculifolia* (*B. dracunculifolia*) é uma planta com forte impacto etnofarmacológico devido a seu uso tradicional pela população de diferentes regiões no Brasil. Este uso vem sendo relatado para atividade antimicrobiana e desordens de

pele (Dos Santos et al., 2010). Conhecida popularmente como “alecrim-do-campo”, “alecrim dourado” e também como “vassourinha”, a *B. dracunculifolia* é uma planta nativa do país, ocorrendo principalmente no cerrado brasileiro, compreendendo a região sudeste e centro-oeste, porém com importante ocorrência também na região Sul do Brasil (SFORCIN et al., 2012).

É uma espécie perene, o que significa que possui um longo ciclo de vida, adaptando-se a condições climáticas diversas. Morfologicamente, *B. dracunculifolia* é um arbusto lenhoso com capacidade de formação de madeira em seus caules, podendo atingir até dois metros de altura e sendo caracterizada por dioicidade, ou seja, apresentando espécimes masculinos e femininos caracterizados por suas florescências em pés separados (Campos et al., 2016).

Suas folhas (Figura 2) possuem tricomas glandulares, responsáveis por produção de algumas secreções como a resina, além disso, possui tricomas tectores que são responsáveis por formação de uma barreira mecânica que ajuda a espécie na redução da perda de água proporcionando assim, sua adaptação a longos períodos de estiagem (SFORCIN et al., 2012).



FIGURA 2 – Folhas de *B. dracunculifolia* coletadas na cidade de Santa Helena, Paraná, Brasil.

Fonte: O Autor

A função dos diferentes tipos de tricomas na folha está intimamente relacionada com a interação de abelhas da espécie *Apis mellifera* L. com a *B. dracunculifolia*, visto que essa planta apresenta óleos essenciais com aroma fortíssimo, facilitando o reconhecimento dessa espécie pelas abelhas citadas

(KUMAZAWA et al., 2003). O alecrim-do-campo é uma planta bastante estudada devido a essa interação com abelhas, assim como por possuir uma diversidade de compostos fenólicos (PARK et al., 2004). Seus tricomas secretores, ricos em metabólitos secundários, são estruturas que produzem e armazenam os óleos essenciais. A importância comercial deste óleo, direcionado para indústria de cosméticos, está diretamente relacionada com a concentração dos compostos nerolidol e espatulenol (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). O fruto dessa interação resulta na coleta de resina de suas folhas pelas abelhas culminando na produção de própolis de alta qualidade e com funções biológicas já conhecidas (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002).

Denominado própolis verde, esse produto apícola de grande interesse econômico e farmacológico é o principal produto da *B. dracunculifolia*. Seu potencial terapêutico vem sendo fortemente descrito, principalmente no que concerne à atividade fungicida, antibiótica e de ativação do sistema imune, fato pelo qual seu uso tem crescido cada vez mais em aplicações científicas e comerciais (AGA et al., 1994; CHANG et al., 2008). Na América do Sul, muito por esta razão, a *B. dracunculifolia* tem um papel importante na economia, onde seu óleo essencial desperta grande interesse, sobretudo para a indústria de perfumaria, conforme descrito por Budel et al. (BUDEL et al., 2005), assim como também na medicina tradicional, sendo o própolis derivado desta planta utilizado como imunomodulador, agente hipoglicemiante e muitas outras funções (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; TROJAN-RODRIGUES et al., 2012; FREIRES et al., 2015).

Alguns relatos na literatura demonstram que *B. dracunculifolia* parece ser quimicamente composta por mono e sesquiterpenos, dos quais o nerolidol, o germacreno-D, o biciclogermacreno, β -cariofileno, e artepillin C já foram descritos como seus principais constituintes, além disso, esses estudos também demonstram que o óleo essencial da planta apresenta características semelhantes em fitoquímica quando comparado ao seu produto derivado, o própolis verde (KLOPELL et al., 2007; MISSIMA et al., 2007; PAULINO et al., 2008).

Estudos *in vitro* e modelos animais foram relatados mostrando o efeito do extrato hidroalcoólico bruto obtido de folhas de *B. dracunculifolia* em edema de pata induzido por carragenina e formalina, onde o extrato produziu um efeito anti-nociceptivo de longa duração no modelo agudo de dor inflamatória, sendo este associado à inibição das atividades de COX-2 (Ciclooxigenase-2) e NF κ -B (DOS

SANTOS et al., 2010). Além disso, alguns experimentos conduzidos com o extrato e ácido caféico (um composto isolado de folhas de *B. dracunculifolia*) induziram ação imunomoduladora em macrófagos murinos após desafio com LPS, estimulando a produção de IL-1 β e inibindo a produção de IL-6 e IL-10 (MISSIMA et al., 2007; BACHIEGA et al., 2013).

Quanto ao seu óleo essencial, existem pouquíssimos estudos na literatura, dentre eles destaca-se o estudo de Massignani et al. (MASSIGNANI et al., 2009) que sugeriu que o óleo essencial extraído das folhas da *B. dracunculifolia* apresenta ação gastroprotetora, aumentando os fatores defensivos da mucosa gástrica em modelos de úlcera induzida por etanol e indometacina. No entanto, apenas alguns estudos demonstraram a atividade farmacológica desta planta e, em menor medida, sua atividade anti-inflamatória em sítios específicos, como a pele.

1.3 O PROCESSO INFLAMATÓRIO NA PELE

A pele, por representar a interface entre o ambiente externo e o organismo, tem como principal função a proteção física e imunológica frente a estímulos nocivos, como rupturas de barreira, entrada de patógenos e outros tipos de lesões como impactos mecânicos ou radiações (LOWES; BOWCOCK; KRUEGER, 2007). Com uma área aproximada de 1,9 m², a pele é responsável também por auxiliar nos processos homeostáticos do corpo humano, atuando como termorreguladora, evitando perda de água e de calor (GOLDSMITH et al., 2012).

É comum que somente quando a pele está doente, seja pelo processo de envelhecimento, por uma lesão física ou um processo cicatricial mal resolvido, passemos a apreciar a importância desse órgão. Pois nossas visões da estrutura da pele tendem a focar-se apenas na aparência ou aspecto que ela apresente, esquecendo-nos por sua vez da dinamicidade desse órgão, capaz de fornecer um *feedback* de tantos processos fisiológicos a nível sistêmico (OH et al., 2014). Afinal, a pele fornece para nós informações bastante importantes sobre nossa saúde real, como quando sinaliza o rubor e edema, o suor ou até mesmo a palidez. Além disso, em muitos casos os diagnósticos de diversas doenças não dermatológicas são afirmados mediante a um sinal clínico que apresentemos na nossa pele (e.g: Icterícia ou doença de Cushing (WONG et al., 2016).

Ainda, células constitutivas da pele são capazes de prover auxílio para sinalizar outros sistemas frente a estímulos diversos, como por exemplo, queratinócitos, melanócitos e células residentes do sistema imunitário, sendo elas Células de Langerhans, Células Dendríticas e Linfócitos T (CD8+), atuando dessa maneira, como uma interface entre nosso corpo e tudo que acontece ao nosso redor. Por muitos autores, a pele é análogo ao ecossistema, denotando que quando há um desequilíbrio entre meio interno e meio externo, podem ocorrer diversas doenças (GRICE; SEGRE, 2011).

Funcionalmente, a pele humana pode ser dividida em três camadas principais com características específicas, diferentes funções ou graus de funcionalidade (Figura 3). A mais externa das camadas é chamada de epiderme, a intermediária é a derme, enquanto a mais profunda, hipoderme, também pode ser conhecida como tecido subcutâneo (PASPARAKIS; HAASE; NESTLE, 2014).

A epiderme é constituída de queratinócitos, células de Merkel e melanócitos, e pode ser considerada a camada mais biologicamente ativa da pele. Da camada mais externa para a mais profunda, existe uma diferença pronunciada na morfologia das células, sendo que as tight junctions selam os espaços intracelulares entre elas. Sua porção mais externa, conhecida como estrato basal, está em constante renovação, passando por processos de cornificação que são adaptativos e comuns a diversas espécies (CAI; FLEMING; YAN, 2012).

Os queratinócitos proliferam somente no estrato basal e, conforme se diferenciam, migram em direção as camadas mais externas, tornando-se queratinócitos sem presença de núcleo, onde então, passam a ser conhecidos como corneócitos, seguindo um fluxo de diferenciação e rotatividade, conforme representado na Figura 3. Esse *turnover* constante permite também que substâncias externas que estão aderidas a pele sejam descartadas com a escamação diária. É o estrato córneo que atua permitindo a perda de água e solutos em excesso para o meio externo e também evita penetração de microrganismos do meio externo para o interno (TERUI, 2000).

Linhagens hematopoiéticas também residem na epiderme, como as Células de Langerhans (LC), transmitindo informações aos linfonodos regionais para gerar ativamente respostas imunes protetoras e reguladoras do hospedeiro (KOBAYASHI; NAIK; NAGAO, 2019).

A derme, por sua vez, é composta principalmente de proteínas da matriz extracelular que conferem estrutura e elasticidade à pele, apresentando fibras reticulares, elastina, além de células produtoras de colágeno. Ao contrário da epiderme, permite a livre migração de populações celulares, uma vez que é uma camada com maior irrigação de vasos sanguíneos, quando comparada à camada mais externa. A derme e a epiderme são separadas pela membrana basal, uma fina folha de proteínas da matriz extracelular que regula o movimento de células e proteínas entre essas duas camadas. Constituintes imunes dérmicos incluem vários subconjuntos distintos de células dendríticas (DC) e células T que estão localizados em forte apelo ao epitélio e, em particular, folículos capilares. Macrófagos, mastócitos, basófilos e eosinófilos também são componentes cruciais do meio imunológico dérmico, como podemos observar na Figura 4 (PASPARAKIS; HAASE; NESTLE, 2014; RICHMOND; HARRIS, 2014; KABASHIMA et al., 2019).

A hipoderme é composta principalmente por adipócitos, mas também contém nervos, sangue e vasos linfáticos. Os adipócitos são células de gordura que sequestram ácidos graxos potencialmente inflamatórios e são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias. Os constituintes hematopoiéticos da hipoderme e suas funções permanecem relativamente inexplorados, uma vez que os estudos que mais se destacam em relação a essa camada da pele tratam-se de estudos sobre termorregulação (RICHMOND; HARRIS, 2014; KOBAYASHI; NAIK; NAGAO, 2019).

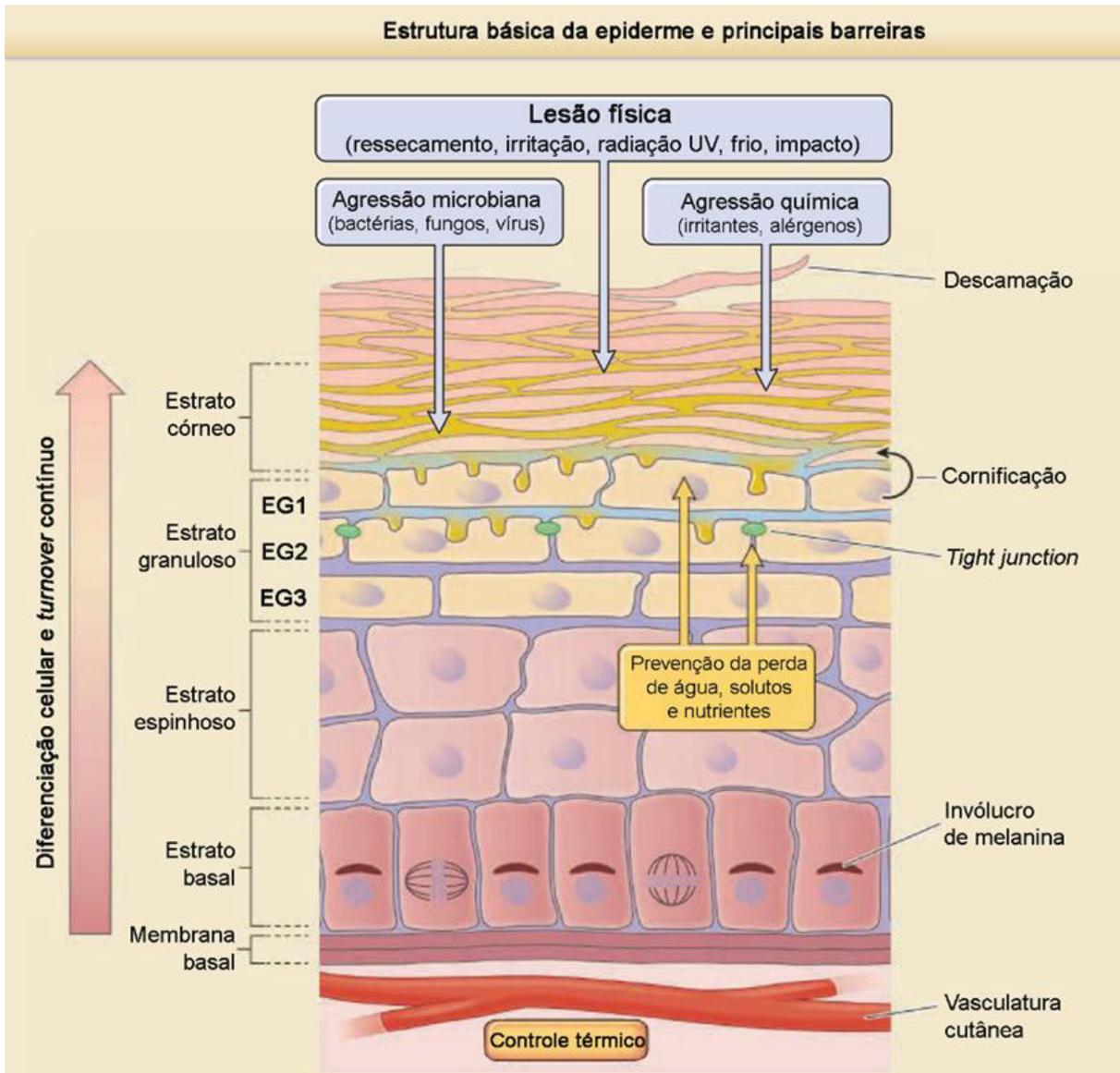


FIGURA 3 – As camadas da epiderme.

Fonte: Adaptado de (GOLDSMITH et al., 2012)

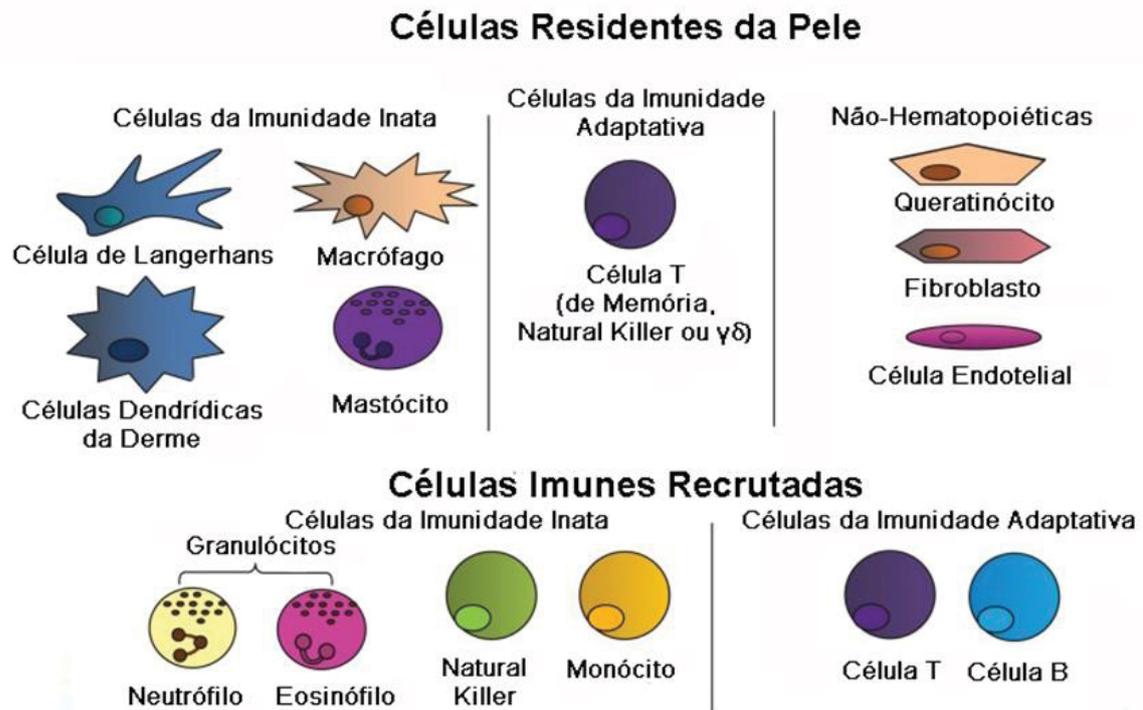


FIGURA 4 – Células do sistema imune da pele.

Fonte Adaptado de (RICHMOND; HARRIS, 2014)

Devido ao seu posicionamento estratégico na interface entre o corpo e o meio ambiente, os queratinócitos epidérmicos recebem sinais do ambiente externo e os transmitem às células imunológicas da pele (PASPARAKIS; HAASE; NESTLE, 2014). Células de Langerhans, células dendríticas dérmicas, macrófagos, outras células inatas (mastócitos, células NK, células NKT, células $\gamma\delta$ -T) e células T de memória compreendem o sistema imunológico residente na pele no estado estacionário. As células de Langerhans, células dendríticas dérmicas, macrófagos e células $\gamma\delta$ -T primeiro detectam infecção ou lesão e iniciam uma resposta rápida e inata que inclui o recrutamento de células efetoras. Os efetores inatos (populações NK) fornecem uma resposta rápida, inespecífica ao antígeno, enquanto as células T da memória fornecem uma resposta rápida e específica à memória do antígeno aos patógenos encontrados anteriormente (GRICE; SEGRE, 2011).

Na ativação do sistema imunológico residente na pele, células imunes adicionais são recrutadas para ajudar a conter e combater a infecção e/ou remover detritos celulares para ajudar no processo de cicatrização. Isso inclui células inatas, como neutrófilos e eosinófilos, bem como populações adaptativas, como células T ou com memória central e células B (BÄSLER; BRANDNER, 2017).

As células dendríticas ajudam no controle contínuo da absorção de proteínas na pele, distinguindo se serão apresentadas em contexto crítico e de alerta, como no caso de uma infecção, ou em um contexto seguro, como a renovação celular normal durante a homeostase tecidual. Para isso existem alguns padrões moleculares que alertam as células imunológicas para o perigo. Esses padrões geralmente estão presentes apenas quando os processos celulares normais foram interrompidos, como visto na infecção, malignidade ou morte celular necrótica. São amplamente referidos como *padrões moleculares associados ao dano* (DAMPs), ou *a patógenos* (PAMPs). Os exemplos incluem lipopolissacarídeo (LPS), flagelina e peptidoglicano de bactérias, RNA de fita dupla de vírus, entre outros, e para reconhecimento destes, existem receptores que como os tipo Toll (TLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs) são expressos principalmente por DCs (RICHMOND; HARRIS, 2014).

A ativação desses receptores promove o processamento e a apresentação de antígenos, a regulação positiva de receptores co-estimuladores para a ativação de células T e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, IL-1 β , TNF- α e outras. O processo resultante do acionamento dessas células culmina na resposta inflamatória, na ativação, as células residentes nos tecidos secretam citocinas pró-inflamatórias que promovem o recrutamento de células efetoras inatas, incluindo neutrófilos, monócitos e células NK. Esses “socorristas” podem iniciar o ataque usando os mecanismos descritos acima. No entanto, uma resposta imune eficaz geralmente requer o envolvimento subsequente do sistema imunológico adaptativo e, portanto, as DCs devem interagir com uma infinidade de células T para regular uma resposta imune precisa e eficaz, ajudando estas a migrarem para a pele. Dessa forma, esse processo de migração é auxiliado por moléculas de adesão das células endoteliais no local da inflamação, como a família das *moléculas de adesão celular* (*cell-adhesion molecules*, CAMs) e integrinas e selectinas que ajudam a guiar as células para o local correto (DENG; CHANG; LU, 2016).

Existem também subfamílias de células T com funções especializadas, incluindo aquelas que são diretamente citotóxicas, outras que suprimem respostas e outras que supervisionam e ajudam a moldar a resposta através da secreção de citocinas. Elas são geralmente designadas com um número para delinear quais tipos de citocinas produzem. Por exemplo, as células Th1 produzem IFN- γ e TNF- α ; Células Th17 produzem IL-17, IL-21 e IL-22; e células ThH2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13 (HEINEMANN et al., 2014). Esses diferentes padrões de citocinas geralmente estão

associados ao recrutamento de tipos ligeiramente diferentes de populações efetoras imunológicas. Por exemplo, as respostas Th2 recrutam basófilos, eosinófilos e mastócitos para coordenar uma resposta antiparasitária, enquanto as respostas Th1 resultam no recrutamento de células para uma resposta antiviral ou antitumoral, e o Th17 promove uma resposta antibacteriana ou antifúngica através do recrutamento de neutrófilos e produção de citocinas e peptídeos antimicrobianos. As respostas Th1 e Th17 também podem promover a autoimunidade, enquanto as respostas Th2 podem mediar a alergia. Sabe-se por exemplo que respostas Th17 e Th2 medeiam parte importante da sintomatologia de doenças como psoríase e dermatite atópica, respectivamente (STUMHOFER et al., 2010).

A resposta inflamatória é crucial nas reações aos possíveis danos que a pele ou outros tecidos possam sofrer. Essa resposta complexa envolve diferentes tipos celulares que em função do processo inflamatório, liberam substâncias especializadas como aminas e peptídeos vasoativos, eicosanoides, citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, que mediam o processo inflamatório, impedindo dano tecidual adicional e, finalmente, resultando em cura e restauração da função tecidual (ABDULKHALEQ et al., 2018)

A inflamação pode ser dividida em duas principais categorias - aguda e crônica - com base no tempo e nas características patológicas. A inflamação aguda típica tem uma duração relativamente curta (horas a dias) e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de líquido rico em proteínas (plasma) e migração de células (principalmente neutrófilos) no local da lesão e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação. Já a inflamação crônica é caracterizada pela duração prolongada (semanas a meses ou anos) em que a inflamação, destruição tecidual e tentativas de reparo estão ocorrendo. A infiltração de células mononucleares e fibrose são características histológicas típicas da inflamação crônica. A inflamação excessiva pode, no entanto, levar a lesões nos tecidos e, se grave, causar descompensação fisiológica, disfunção orgânica e morte (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Atualmente os tratamentos terapêuticos disponíveis para a maioria das doenças inflamatórias cutâneas crônicas não são totalmente eficazes, visto que os que promovem melhoras na sintomatologia do paciente, muitas vezes ocasionam diversos efeitos indesejáveis. Portanto, a busca por novas estratégias efetivas e eficazes é extremamente necessária e importante. Nesse sentido, as plantas

medicinais são uma fonte crucial para a pesquisa de novos tratamentos devido à sua grande diversidade de compostos biológicos e ativos.

1.4 DOENÇAS DERMATOLÓGICAS

As doenças dermatológicas podem ser denominadas como “dermatites”, sendo este um termo geral usado como referência para doenças inflamatórias da pele. Estes podem ser considerados como dermatite de contato alérgica, dermatite de contato irritativa, psoríase e muitas outras doenças frequentes que têm grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos expostos a elas (GOFF et al., 2015; KOSTNER et al., 2017).

A fisiopatologia dos diferentes tipos de dermatites não é totalmente compreendida e pode estar associada à uma sensibilização inicial ou “*start*”, assim como a defeitos na barreira cutânea (ALAVI et al., 2016; KOSTNER et al., 2017). Na psoríase, por exemplo, pode estar relacionado a fatores ambientais, além do envolvimento imunológico ou hereditário, combinando-se com a expressão de vários genes que podem predispor a doença. A prevalência de psoríase na Europa e na América do Norte é de cerca de 2% e está aumentando a cada ano, estima-se que mundialmente 125 milhões de pessoas sofrem com psoríase, de acordo com a *World Psoriasis Day consortium* (STERN et al., 2004; WAGNER et al., 2010). Além disso, existe uma preocupação constante relacionada ao fato de que indivíduos com doenças dermatológicas apresentam maior risco de desenvolver diversas comorbidades crônicas e graves, como ansiedade, artrite reumatoide ou depressão (VALDIMARSSON, 2007; CAI; FLEMING; YAN, 2012; STROBER et al., 2018). Fica evidente que a etiologia da psoríase ainda não é bem conhecida e descrita, e, embora haja um envolvimento genético evidente, ele parece não ser suficiente para a que os sintomas apareçam, mesmo que atue como um predisponente para isso, sendo necessária a interação com estímulos ambientais para a expressão de genes importantes e posterior desenvolvimento da doença (ORTONNE, 1996).

Dentre as principais manifestações clínicas da psoríase destacam-se as placas eritematosas elevadas e descamativas, que ocorrem principalmente em locais de grande tensão como as dobras corporais (JIN; WANG, 2014). A ocorrência de comorbidades em saúde mental também é relatada, visto que não é incomum que esses pacientes desenvolvam sintomas depressivos e de ansiedade, uma vez que a

influência negativa da doença psoriática no bem-estar físico e mental do paciente, em combinação com a fisiopatologia sobreposta, aumenta o risco de condições psiquiátricas clinicamente significativas (WU et al., 2018).

As características histológicas mais proeminentes na psoríase são o aumento da espessura da epiderme, proliferação de vasos sanguíneos da derme e infiltrado inflamatório (LOWES et al., 2013). Eventos imunológicos que colaboram para a patogênese da doença envolvem desregulação de mediadores envolvidos na resposta imune capazes de modificar a estrutura da pele, como resultados obtêm-se uma resposta inflamatória prolongada com reepitelização contínua, por essa razão alguns autores defendem a ideia de que lesões psoriáticas funcionam de maneira semelhante a um processo de cicatrização prolongado (DENG; CHANG; LU, 2016)

A inflamação observada na pele de pacientes com psoríase provém de reconhecimento de antígenos epidérmicos que estimulam persistentemente a resposta de linfócitos T. Dentre elas foram identificadas como predominantes na doença células Th1 (AUSTIN et al., 1999) e Th17, sendo estas mais relacionados com a exacerbação da doença (TEUNISSEN et al., 1998; DENG; CHANG; LU, 2016).

Além disso, células da imunidade inata incluindo as células apresentadoras de antígenos (APC) e as células NK também participam da patogênese da psoríase através da secreção de citocinas imunorreguladoras, como interleucina (IL)-12, IL-23 e outras (GASPARI, 2006) Essas citocinas modulam profundamente a diferenciação e a função de linhagens de células T múltiplas, contribuindo assim para a progressão da psoríase (STUMHOFER et al., 2010; HEINEMANN et al., 2014).

A patogênese da psoríase é extensa e complexa, assim como seu tratamento, que pode variar dependendo da gravidade do quadro. Existem hoje algumas alternativas terapêuticas disponíveis, porém nenhum tratamento é completamente eficaz, pois a maioria leva a efeitos indesejáveis que prejudicam a adesão medicamentosa. Para isso torna-se de extrema importância a busca de novas terapias efetivas e seguras (COHEN; BARON; ARCHER, 2012).

1.5 FARMACOTERAPIA E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS EM DOENÇAS DE PELE

Os tratamentos tópicos são os mais comumente utilizados nas doenças de pele mas, dependendo da gravidade da lesão, são insuficientes ou apresentam

inúmeros efeitos adversos, como observado na terapia com corticosteroides (HUANG et al., 2019). Por esse prisma, plantas medicinais são alvos de grande interesse quando o assunto é busca de novas drogas para o tratamento de doenças nas quais há falhas na terapia medicamentosa ou demasiados efeitos adversos. Isto traz ainda mais importância para a investigação das capacidades bioativas e potenciais aplicações medicinais das plantas (HUANG et al., 2019).

Os produtos naturais são o principal recurso de estudo de novas drogas nos últimos 30 anos, sendo que representam cerca de 51% das aprovações da FDA (*Food and Drug Administration*), agência regulatória dos Estados Unidos da América. Dentre essas aprovações, encontram-se drogas proveniente de produtos naturais, sejam elas sintéticas ou semissintéticas (NEWMAN; CRAGG, 2016). Alguns estudos demonstram que aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos são derivados de plantas medicinais, e 11% dos medicamentos considerados essenciais são exclusivamente de origem vegetal (SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010).

Pacientes que são acometidos com doenças inflamatórias crônicas da pele constantemente sofrem com a ausência de terapias precisas e seguras, com eficácia comprovada. Grande parte da terapêutica disponível não é efetiva ou apresenta extensos efeitos adversos, que tornam sua aplicação inviável. Nesse aspecto, essa temática torna-se extremamente impactante, levando tanto a indústria farmacêutica como a ciência e pesquisa a estarem em busca de novas alternativas para implementação na terapia clínica dos pacientes acometidos por doenças dermatológicas severas (GARCIA-PEREZ; JEAN; POULIOT, 2012).

O uso de plantas medicinais pode, portanto, fornecer grandes benefícios no que concerne ao tratamento de doenças de pele, sendo que uma das vantagens dos fitoterápicos em relação a um composto isolado é a sua composição complexa, considerando que suas atividades biológicas podem ser resultado da combinação de vários compostos atuando dinamicamente entre si, levando à um efeito sinérgico e que muitas vezes pode resultar em melhora clínica comprovada (NIKAM et al., 2012).

As plantas utilizam de misturas complexas e diversas, seus metabólitos secundários, de diferentes classes estruturais e químicas, auxiliam as plantas a se protegerem de herbívoros ou para adaptação a diferentes condições que favoreçam sua reprodução. Essas misturas complexas de metabólitos podem fornecer compostos com diferentes mecanismos de ação, e, uma vez que um composto é isolado, torna-se possível descobrir seu mecanismo de ação e investigar seus

possíveis efeitos fisiológicos em um determinado sistema. Porém, a maioria dos metabólitos secundários aparentam interferir com diversos alvos intracelulares, uma vez que os componentes são não apenas aditivos, mas aparentemente sinérgicos em sua bioatividade. Logo, a fitoterapia é capaz de empregar à terapia medicamentosa a oportunidade de utilização desse sinergismo dinâmico como uma abordagem terapêutica única, com vantagens sobre os compostos isolados, uma vez que comprovada sua eficácia e segurança (WINK, 2008).

Atualmente existem diversas famílias de plantas pelas quais o interesse tem crescido a partir do ponto de vista da pesquisa. Dentre elas destacam-se estudos botânicos e farmacológicos com o gênero *Baccharis*, pertencente à família Asteraceae (BUDEL et al., 2005).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Uma vez que as evidências apontam que o uso de plantas medicinais e/ou seus compostos isolados possuem ações positivas no tratamento de diversas doenças inflamatórias, torna-se interessante o estudo da participação do óleo essencial do *B. dracunculifolia*, uma planta ainda pouco estudada, em um modelo de doença dermatológica. Logo, pode ser possível obter novas informações que permitam maior compreensão dos pontos de controle endógeno da resposta inflamatória, oferecendo, assim, perspectivas promissoras sobre a patogênese de dermatites para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais precisas e eficazes. Além disso, esse estudo busca evidenciar e ajudar a estabelecer a comprovação científica do uso popular da planta, assim como obter novos dados de segurança e a aplicabilidade etnofarmacológica da *B. dracunculifolia* e seu óleo essencial.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade anti-edematogênica e anti-inflamatória do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* (OEBd) na pele.

3.1.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito da aplicação tópica do OEBd na resposta inflamatória causada pelo ester de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e alterações causadas pelo óleo essencial de *B. dracunculifolia* no modelo de edema de orelha induzida por aplicação única de TPA;
- Analisar a ação do tratamento tópico com OEBd no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico;
- Verificar o efeito do tratamento tópico com o OEBd em modelo de hiperproliferação da epiderme por aplicações repetidas de TPA;
- Analisar potenciais efeitos sistêmicos do tratamento tópico de OEBd no modelo de TPA;
- Verificar a influência da aplicação repetida do OEBd na pele e em órgãos linfoides;
- Averiguar se o efeito anti-inflamatório do óleo essencial envolve receptores glicocorticoides.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DROGAS

Todas as drogas utilizadas no estudo estão apresentadas na Tabela 1, assim como o veículo e via de administração escolhidos para realização do trabalho.

DROGAS E DOSES UTILIZADAS	Texto
12-O-tetradecanoilforbol-acetato 2,5µg	TÓPICA: ACETONA
Ácido Araquidônico (AA) 2mg	TÓPICA: ACETONA
Dexametasona (DEXA) 0,1 mg	TÓPICA: ACETONA
Indometacina (INDO) 2 mg	TÓPICA: ACETONA
Mifepristona RU-486 (50 mg/kg)	SUBCUTÂNEA: PEG 400

TABELA 1 – Drogas e doses utilizadas no estudo

Fonte: O Autor

4.2 REAGENTES

N-acetil-β-D-glicosaminidase; Brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB); a tetrametilbenzidina (TMB) comprados de Chemcil Co (St. Louis MO); acetona, formaldeído, ácido acético glacial, parafina, dimetilformamida, Hematoxilina tamponada com fosfato (PBS) e Eosina foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Anticorpo policlonal anti-PCNA (sc-9857) 1:100, Anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP - peroxidase de rábano, sc-2020) 1:100 (Santa Cruz Biotechnology®, EUA), DAB substrato de diaminobenzidina com peroxidase (BD Biosciences harmigen®, EUA). Outros reagentes químicos de grau analítico foram comprados de fornecedores químicos locais.

4.3 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Folhas de *B. dracunculifolia* foram coletadas em Maio de 2018, na cidade de Santa Helena no Oeste do Estado do Paraná, Brasil. A identificação botânica foi realizada pelo professor Dr. Gustavo Heiden do Herbário ECT - Embrapa Clima Temperado, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, onde as exsiccatas foram depositadas com os números de registro: ECT0003428.

4.4 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O material vegetal foi seco à temperatura ambiente por 4 dias e aproximadamente 100 gramas de folhas foram submetidas a hidrodestilação por 3 h usando um aparelho do tipo Clevenger (ASCARI et al., 2019), conforme representado na Figura 5. O óleo essencial obtido foi separado do hidrolato utilizando éter etílico e a fase orgânica foi seca com N_2SO_4 . A solução foi filtrada e o solvente foi evaporado a baixa temperatura. Os rendimentos das amostras de óleos essenciais foram calculados levando em conta a massa material vegetal inicial seco.



FIGURA 5 – Aparelhos utilizados na extração do óleo essencial.

Fonte: O Autor (2019)

O óleo essencial foi analisado em Cromatógrafo Gasoso Shimadzu GCMS-QP2010 Plus com uma coluna apolar RTx5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm). Utilizaram-se as seguintes condições de análise: razão de 1/20, 250 °C e temperatura do injetor de 250 °C na fonte de íons e 280 °C na interface. A temperatura do forno foi programada para 60 °C durante os primeiros 5 min, aumentando a uma taxa de 3 °C/min para atingir a temperatura final de 240 °C. Os componentes foram identificados com base na comparação dos índices de retenção relativos calculados utilizando uma

série de n-alcenos (C8-C19) e os espectros de massas do banco de dados do aparelho, seguindo pela comparação com os índices de retenção com os dados publicados na literatura (Adams, 2009).

A análise quantitativa permitiu a determinação das proporções relativas dos componentes das amostras dos óleos essenciais utilizando um cromatógrafo Shimadzu Gas 2010 com detector de ionização de chama (GC-FID) e uma coluna OV-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). O gás He foi utilizado como gás de arraste a um fluxo contínuo de 1mL/min, razão de 1/20, e o volume de injeção foi de 1 uL de amostra diluída em éter etílico com o detector a 280 °C e injetor a 250 °C. A temperatura inicial da coluna foi ajustada para 60 °C durante 5 minutos e programada para aquecimento a uma taxa de 3 °C/min até atingir a temperatura final de 240 °C.

4.5 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados em camundongos Swiss fêmeas 8-10 semanas de idade, com peso entre 20-25 g. Os animais foram alocados aleatoriamente em diferentes grupos e ração e água foram fornecidos *ad libitum* enquanto foram alojados no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob condições padronizadas de biotério: ciclo claro/escuro de 12 h com luzes acesas às 7h, sob temperatura ambiente controlada (23 ± 2 ° C) e umidade ($60 \pm 10\%$). Os camundongos foram mantidos em grupos de seis animais em caixas de polipropileno de fundo sólido e autoclavável contendo as medidas de 41x34x17,8 cm, forradas com cepilho comercial. O período de adaptação foi de 48h antes do início dos experimentos e todos os animais utilizados nesse trabalho passaram por experimentos uma única vez.

Todos os experimentos aqui realizados seguem a recomendação das diretrizes ARRIVE – do inglês, *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (KILKENNY et al., 2011), assim como do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Esse projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sob número de registro 1257.

4.6 EXPERIMENTO 1: MODELOS EXPERIMENTAIS DE DERMATITE AGUDA

Foram utilizados dois modelos pré-clínicos para indução de dermatite de contato do tipo irritativa, o primeiro deles, utilizado como peça-chave no desenvolvimento de todo esse trabalho foi o modelo de aplicação única e tópica de TPA. Este é um modelo reprodutível e de fácil manuseio, que consiste na aplicação do agente causador da estimulação inflamatória (TPA) na orelha direita dos animais, sendo que a resposta inflamatória foi avaliada através da formação do edema e verificação da migração celular em posterior análise histológica (DE YOUNG et al., 1989).

Dessa maneira, a formação do edema foi avaliada através da aferição da espessura basal da orelha dos animais, na região medial da orelha, com auxílio de um micrometro digital (MT-045B, Shangai Metal Great Tools Co., Ltd., Xangai, China), antes da indução do processo inflamatório e depois da indução, em dois pontos no tempo: 6 e 24 h após a aplicação de TPA na dose de 2.5 µg / orelha (DE YOUNG et al., 1989; GÁBOR, 2000). O *OEBd* foi aplicado nas doses de 0,1; 0,3 e 1,0 mg/orelha, assim como o controle positivo dexametasona 0,1mg/orelha, sendo que todos os tratamentos foram aplicados no volume de 20 µl/orelha (Figura 6).

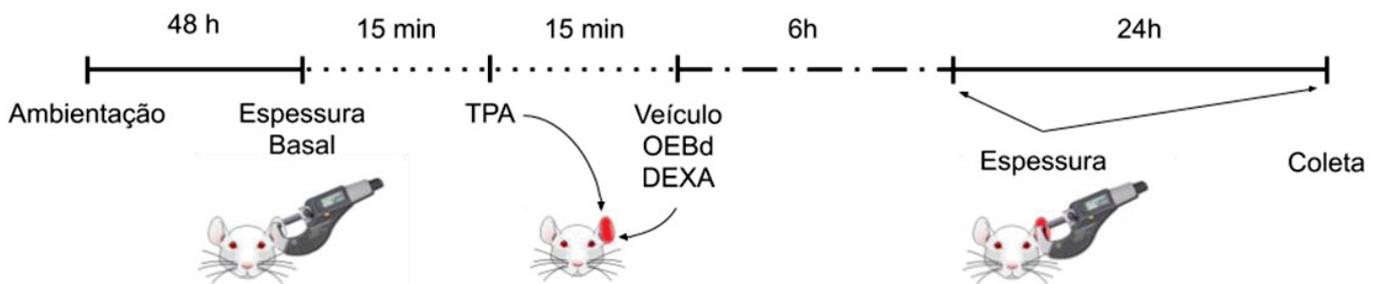


FIGURA 6 – Representação esquemática do modelo de dermatite induzida por TPA.

Fonte: O Autor

O modelo do ácido araquidônico (AA) também foi empregado com o intuito de avaliar a atividade anti-edematogênica do óleo essencial. Nesse modelo, o agente indutor da inflamação é o AA (2 mg/orelha), que se assemelha em alguns parâmetros ao modelo do TPA. Uma diferença é que no modelo do AA o pico da resposta inflamatória ocorre 1 h após a aplicação, portanto é neste tempo que a espessura da orelha é medida. Nesse modelo *OEBd* foi aplicado nas doses de 0,1; 0,3 e 1,0 mg/orelha, assim como o controle positivo indometacina (2,0 mg/orelha). Todos os tratamentos foram aplicados no volume de 20 µL/orelha (Figura 7).

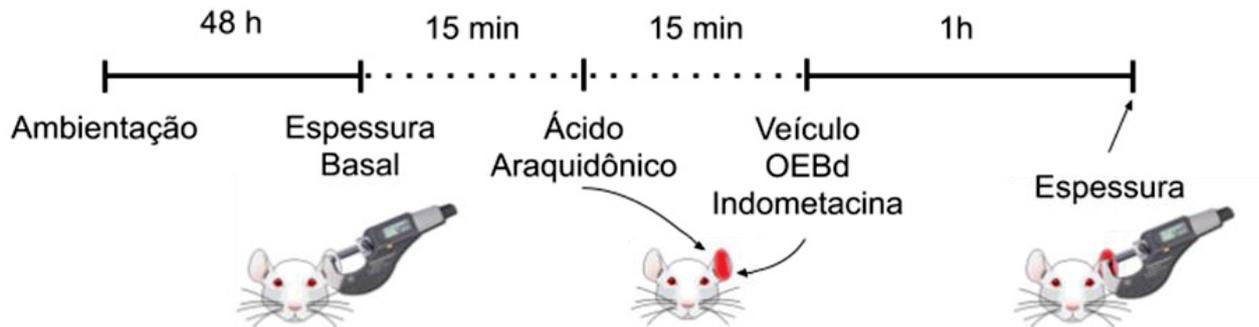


FIGURA 7 – Representação esquemática do modelo de dermatite induzida por AA

Fonte: O Autor

4.7 EXPERIMENTO 2: INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE PELE INDUZIDA POR MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA

Com o objetivo de avaliar a ação do *OEBd* em um processo inflamatório crônico estabelecido, foi realizado o modelo de múltiplas aplicações de TPA (2,5 µg/orelha) em dias alternados por 9 dias. *OEBd* foi diluído em acetona e aplicado na dose de 1,0 mg/orelha, (dose determinada por dados preliminares obtidos nos experimentos anteriores), e dexametasona na dose de 0,1 mg/orelha, os tratamentos foram aplicados duas vezes ao dia a partir do quinto dia do protocolo experimental ilustrado na figura 8. O edema foi avaliado diariamente seguindo a metodologia descrita anteriormente (STANLEY et al., 1991). No nono dia do experimento os animais foram eutanasiados e amostras de tecido da orelha (*punch* de 6 mm) foram coletadas, para avaliação das atividades enzimáticas assim como análise histológica e imunohistoquímica.

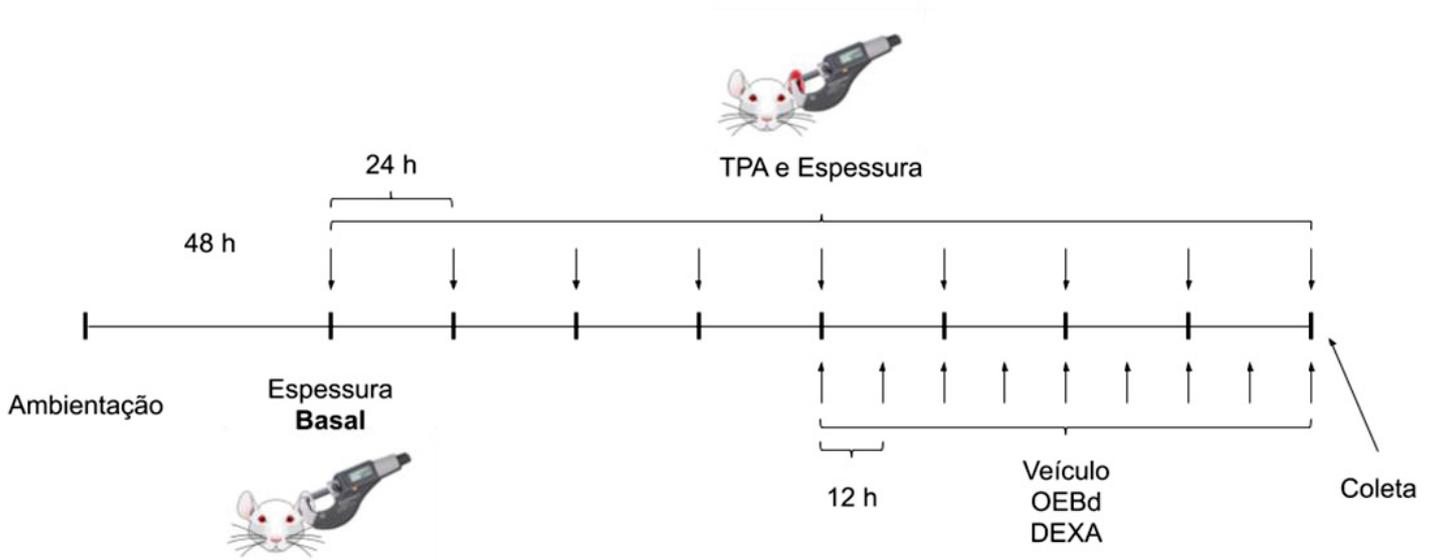


FIGURA 8 – Representação esquemática do experimento crônico induzido por múltiplas aplicações de TPA

Fonte: O Autor

4.8 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ÓLEO ESSENCIAL DE *B. DRACUNCULIFOLIA* E DE EFEITO TIPO CORTICOIDE.

Para investigar se a aplicação crônica do OEBd poderia causar alguma alteração nos órgãos linfoides similar aos causados por terapia com corticóides, verificamos inicialmente seu possível efeito sistêmico. Para isso, TPA em uma única aplicação tópica (2,5 µg/orelha, inseridos em 20 µl) foi utilizado para induzir inflamação local na orelha direita (conforme descrito anteriormente). Em seguida o OEBd (1,0 mg/orelha) e dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo) diluídos em acetona, foram aplicados topicamente na orelha contralateral (orelha esquerda), seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.6. A variação da espessura da orelha foi avaliada 6 h após a aplicação de TPA (DE YOUNG et al., 1989).

Em outro momento, os animais foram tratados com OEBd (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo), por via tópica duas vezes ao dia. Os animais foram pesados todos os dias durante 7 dias e a espessura da orelha foi medida antes do início do tratamento e após o último dia de tratamento como ilustrado na figura 9. No oitavo dia, os animais foram eutanasiados e o peso do baço, glândulas

adrenais, linfonodos auriculares e timo foram pesados para comparação com os parâmetros do controle (Naive).

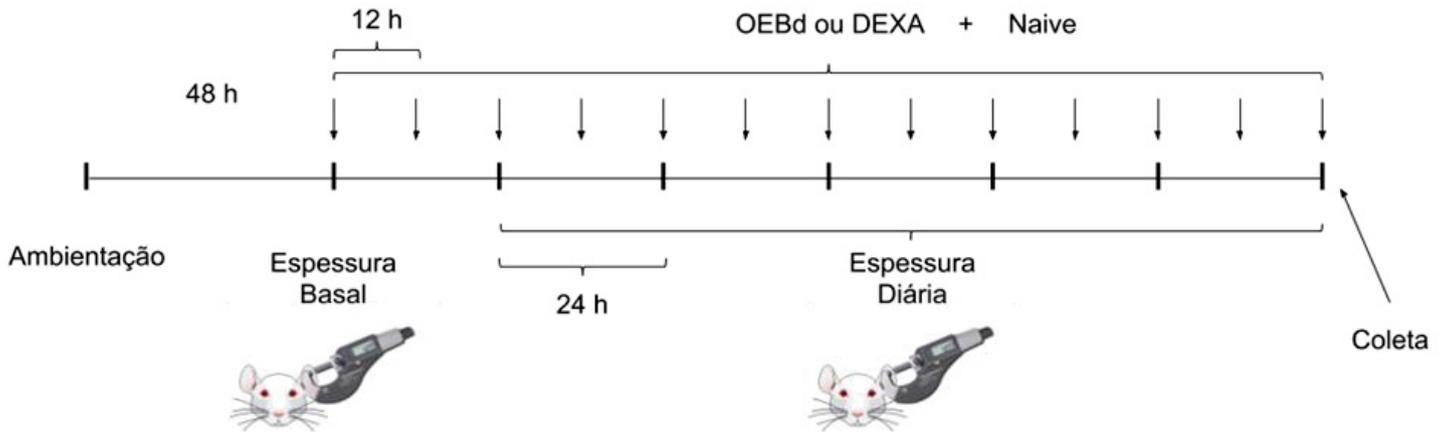


FIGURA 9 – Representação esquemática do experimento crônico para avaliação da segurança da aplicação de OEBd

Fonte: O Autor

Para verificar um possível envolvimento dos receptores de corticosteróides na atividade anti-inflamatória tópica do OEBd, os animais foram pré-tratados com o antagonista RU486 (mifepristona) (50 mg/kg, sc) ou com o veículo polietilenoglicol 400 (PEG400, v/v, sc) e após 30 min o edema de orelha foi induzido pela aplicação de TPA (Figura 10). Em seguida os tratamentos tópicos foram realizados com OEBd (1,0 mg/orelha) e dexametasona (0,1 mg/orelha). A espessura da orelha e a medida da atividade da mieloperoxidase (MPO) foram utilizadas como um indicadores do processo inflamatório, e para avaliar a possível reversão causada pelo antagonista (CASTINETTI; BRUE; CONTE-DEVOLX, 2012).

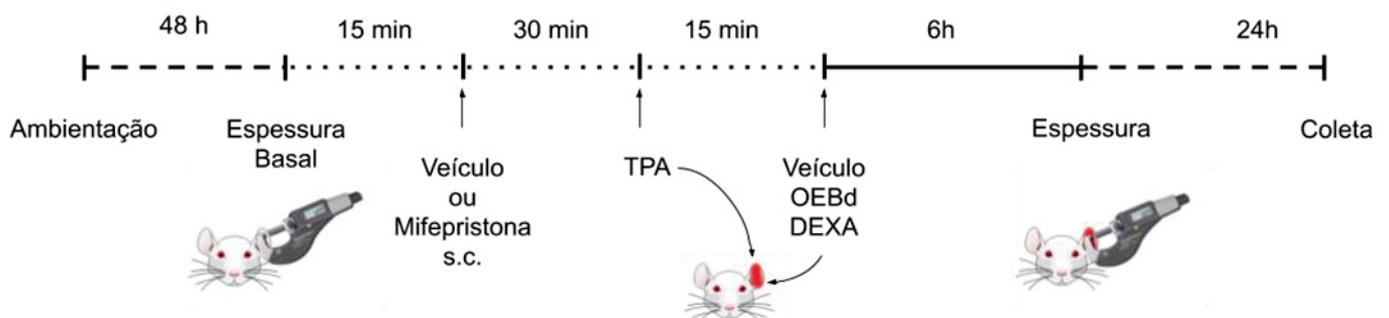


FIGURA 10 – Representação esquemática do experimento crônico para avaliação de um possível mecanismo de ação do OEBd

Fonte: O Autor

4.9 ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO) E N-ACETIL- β -D-GLICOSAMINIDASE (NAG)

A avaliação da atividade das enzimas MPO e NAG, presentes em vesículas de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, respectivamente, foi utilizada como marcador indireto da presença destes tipos celulares. Amostras (*punch* de 6 mm de tecido) foram coletadas ao final do tratamento e adicionadas a 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0°C, seguido da adição de 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. O homogenato foi centrifugado a 12000 xg a 4 °C por 15 min. Para análise de MPO, triplicatas de 30 μ L do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 200 μ L de solução (PBS 80 mM, PBS 0,22 M e peróxido de hidrogênio 0,017%) em cada poço. Nessa análise enzimática a reação é iniciada com a adição de tetrametilbenzidina (TMB) 18,4 mM em solução aquosa de dimetilformamida a 8%. A placa foi incubada a 37°C por 3 min a reação interrompida pela adição de acetato de sódio 1,46 M em cada poço. Para análise de NAG, triplicatas de 25 μ L do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente foi adicionado solução de NAG (*p*-nitrofenil-2-acetamida- β -D-glucopiranoside) 2,24 mM e tampão citrato 50 mM. As amostras foram incubadas durante 60 minutos a 37 °C e a reação interrompida com a adição de tampão de glicina 200 mM em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) com comprimento de onda de 620 nm (MPO) e 450 nm (NAG), sendo expressa em mDO/biópsia. (BRADLEY et al., 1982; DE YOUNG et al., 1989; SÁNCHEZ; MORENO, 1999).

4.10 ANÁLISE DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS

As amostras da pele dos animais tratados foram coletadas e fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) num período de 16 h, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 μ m com auxílio de um micrótomo e posteriormente foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E). A

infiltração de leucócitos, edema, espessura da epiderme, distribuição das camadas da epiderme e a presença de células nucleadas na epiderme foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 200x e/ou 400x. A quantificação dos leucócitos presentes na derme e epiderme será realizada através da contagem dessas células por campo com aumento de 400x, sendo analisados 5 campos de 3 ou mais cortes histológicos distintos. Estas análises foram realizadas com auxílio do software *ImageJ*.

4.11 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA ANTIGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA).

Cortes de (6 mm) de tecido previamente fixado em ALFAC e embebidas em parafina foram colocadas em lâminas de vidro revestidas com gelatina e desparafinizadas duas vezes com xileno, seguido de reidratado através de um banho de álcool graduado. Para bloquear o radical aldeído, cada corte foi incubado com glicina (0,1 M) e com peróxido de hidrogénio a 3% em metanol para bloquear a peroxidase endógena. Os cortes foram também incubados com albumina de soro bovino a 1% (BSA) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para diminuir a chance de coloração não específica. Para a detecção de PCNA, as lâminas foram incubadas com diluições 1:100 de um anticorpo policlonal anti-PCNA (1:100, sc-9857-Santa Cruz Biotech, Inc., EUA) em PBS/BSA 1% em temperatura ambiente em câmara úmida por 2h e lavado com PBS/BSA 1%. Posteriormente, os cortes foram incubados utilizando um anticorpo secundário IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, EUA) diluído 1: 100 em PBS/BSA a 1% em temperatura ambiente em câmara úmida por 1 h. Os sítios de ligação à peroxidase foram detectados por coloração com o kit de substrato DAB (BD Bioscience, Califórnia, EUA) e incubados por 15 min. Finalmente os cortes foram contrastados com hematoxilina de Mayer e depois as lâminas foram desidratadas e montadas.

4.12 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA CITOQUERATINA 14 (CK-14)

Cortes de (6 mm) de tecido previamente fixado em ALFAC e embebidas em parafina foram colocadas em lâminas de vidro revestidas com gelatina e desparafinizadas duas vezes com xileno, seguido de reidratado através de um banho

de álcool graduado. Para bloquear o radical aldeído, cada corte foi incubado com glicina (0,1 M) e com peróxido de hidrogénio a 3% em metanol para bloquear a peroxidase endógena. Os cortes foram também incubados com albumina de soro bovino a 1% (BSA) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para diminuir a chance de coloração não específica. Para a detecção de CK-14, as lâminas foram incubadas com diluições 1:100 de um anticorpo policlonal anti-CK-14 (sc-17104 - Santa Cruz Biotech, Inc., EUA) em PBS/BSA 1% em temperatura ambiente em câmara úmida por 2 h e lavado com PBS/BSA 1%. Posteriormente, os cortes foram incubados utilizando um anticorpo secundário IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, EUA) diluído 1: 100 em PBS/BSA a 1% em temperatura ambiente em câmara úmida por 1 h. Os sítios de ligação à peroxidase foram detectados por coloração com o kit de substrato DAB (BD Bioscience, Califórnia, EUA) e incubados por 15 min. Finalmente os cortes foram contrastados com hematoxilina de Mayer e depois as lâminas foram desidratadas e montadas.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). A significância estatística entre os grupos foi avaliada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de teste post-hoc de *Bonferroni*, ou ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de *Bonferroni* para o modelo crônico de TPA e para o experimento com antagonista farmacológico RU-486. O nível de significância aceito para os testes foi de $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software Statistical GraphPad Prism versão 6.0, La Jolla California, USA.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA

A análise fitoquímica do *OEBd* foi realizada na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, situada na cidade de Santa Helena, com a colaboração dos professores Dra. Jociane Ascari e Dr. Gustavo Heiden. Na caracterização do perfil cromatográfico do *OEBd* foram detectados 31 compostos principais, representados na Figura 11A. As maiores porcentagens relativas foram para os compostos Limoneno (6.76%), β -cariofileno (8.44%), Bicyclogermacreno (14.18%) e Nerolidol (8.02%) (Figura 11B).

A

Compostos	RI ^a	RI ^b	OEBd
α-Pineno	933	939	1,64
β-Pineno	977	979	5,25
Mirceno	992	990	0,81
Limoneno	1030	1029	6,76
Ocimeno <(E)-β->	1049	1050	0,26
Terpinen-4-ol	1179	1177	0,14
α-Terpineol	1192	1188	0,20
δ-Elemeno	1339	1338	0,65
α-Cubebeno	1352	1351	0,35
α-Ylangeno	1374	1375	0,14
Isoledeno	1375	1376	0,16
α-Copaeno	1378	1376	0,48
β-Elemeno	1395	1390	0,91
α-Gurjuneno	1413	1409	0,74
β-Cariofileno	1423	1419	8,44
β-Gurjuneno	1432	1433	0,28
Aromadendreno	1442	1441	2,40
α-Humuleno	1457	1454	1,64
allo-aromadendreno	1464	1460	1,46
γ-Muuroleno	1481	1479	0,53
Germacreno D	1486	1481	9,94
Biciclogermacreno	1502	1500	14,18
α-Muuroleno	1505	1500	1,09
γ-Cadineno	1518	1513	1,36
δ-Cadineno	1529	1523	5,51
trans-Cadina-1,4-dieno	1537	1534	0,26
α-Cadineno	1542	1538	0,28
α-Calacoreno	1547	1545	0,13
Nerolidol	1570	1563	8,02
Espatulenol	1584	1578	4,79
Viridiflorol	1597	1592	2,34
Porcentual de compostos (%)			81,11
Rendimentos (m/m) (%)			1,28

B

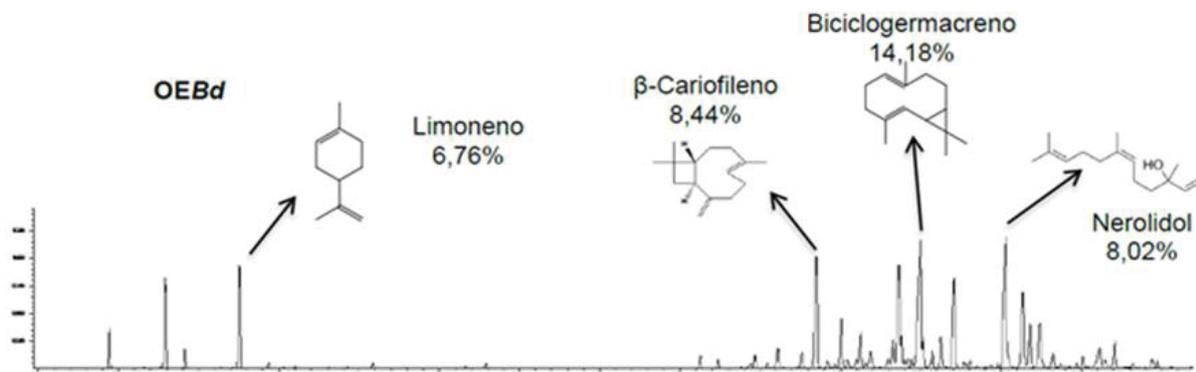


FIGURA 11 – Caracterização dos compostos isolados do OEBd, por extração através de CGMS.

O óleo das folhas de OEBd foi submetido à cromatografia gasoso acoplado a espectrometria de massas (Shimadzu -GCMS-QP2010 Plus)

5.1 EFEITO ANTIEDEMATOGÊNICO DO *OEBd* TÓPICO NA DERMATITE IRRITATIVA INDUZIDA POR TPA

A aplicação tópica do TPA promoveu um aumento significativo na espessura da orelha medida 6 e 24 h após a sua administração. Todas as concentrações testadas do *OEBd* reduziram a formação de edema induzido por TPA quando aplicado topicamente (Figura 12A E 12B). As maiores inibições do edema as 6 h foram observadas nas doses de 0,1 e 1,0 mg/orelha, sendo elas de $67,4 \pm 9,4\%$ e $81,8 \pm 5,9\%$, respectivamente, em comparação com o grupo controle (Figura 12A). 24 h após a aplicação de TPA, o efeito do óleo ainda pôde ser visto, atingindo inibições de $85,6 \pm 7,4\%$ para 0,1 mg/orelha e $95,0 \pm 5,0\%$ para 1,0 mg/orelha (Figura 12B). Curiosamente, a dose de 0,3 mg/orelha foi menos eficaz, também reduzindo o edema de orelha em 6 e 24 horas ($44,4 \pm 7,9\%$ e $52,6 \pm 10,2\%$, respectivamente). O controle positivo dexametasona apresentou diminuição de $94,7 \pm 3,4\%$ em 6 h e $96,1 \pm 3,8\%$ em 24 h do edema de orelha quando comparado com o grupo controle

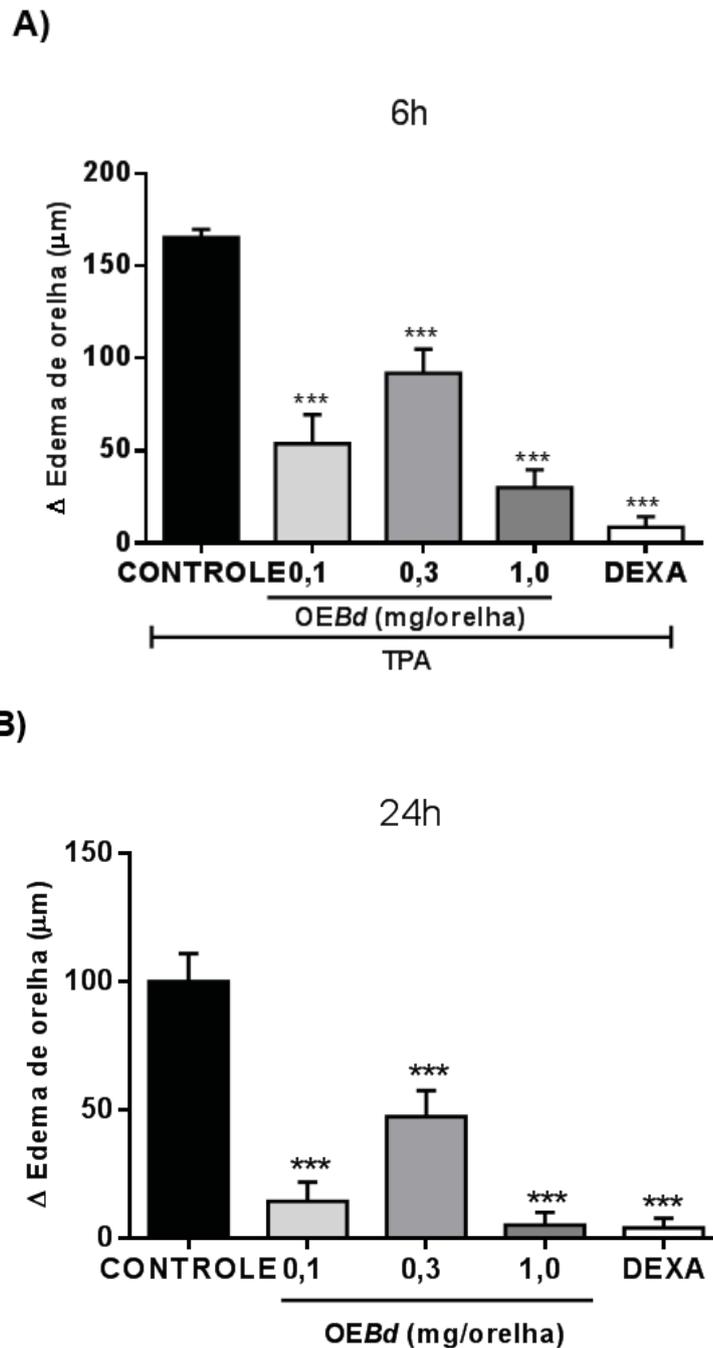


FIGURA 12 – Efeito antiedematogênico do OEBd em modelo de inflamação aguda induzida por TPA.

O processo inflamatório foi induzido pela aplicação tópica de 2,5 μg de TPA, inseridos em 20μL de acetona. Logo após, o tratamento com OEBd nas doses de 0,1, 0,3 e 1,0 mg/orelha, assim como dexametasona (0,1mg/orelha) foram realizados. Após 6h (A) e 24h (B) da aplicação do TPA a espessura da orelha dos animais foi aferida. As barras verticais representam a média ± EPM (n=6). Os símbolos representam o nível de significância em comparação ao grupo controle: ***p<0,001 realizados por ANOVA de uma via seguido por *post-hoc* de Bonferroni.)

5.1 EFEITO DO *OEBd* TÓPICO SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR NA DERMATITE IRRITATIVA INDUZIDA POR TPA

Como mostrado na Figura 13A, a aplicação de TPA promoveu um aumento na atividade da enzima MPO, enquanto o tratamento tópico com *OEBd* reduziu a atividade da MPO em todas as doses. As inibições foram de $77,6 \pm 22,2\%$ (0,1 mg / orelha), $71,1 \pm 13,9\%$ (0,3 mg / orelha) e $93,6 \pm 0,6\%$ (1,0 mg / orelha) quando comparadas ao grupo controle. O controle positivo, a dexametasona, foi capaz de reverter o aumento da atividade enzimática da MPO em $98,5 \pm 0,4\%$.

Além disso, através da análise histológica, observamos que o tratamento com *OEBd* reduziu o número de células em $64,3 \pm 3,9\%$ (0,1 mg / orelha), $82,7 \pm 2,7\%$ (0,3 mg / orelha), $97,1 \pm 0,4\%$ (1,0 mg / orelha) enquanto a dexametasona reduziu em $97,6 \pm 0,6\%$ (Figuras 13 B e C).

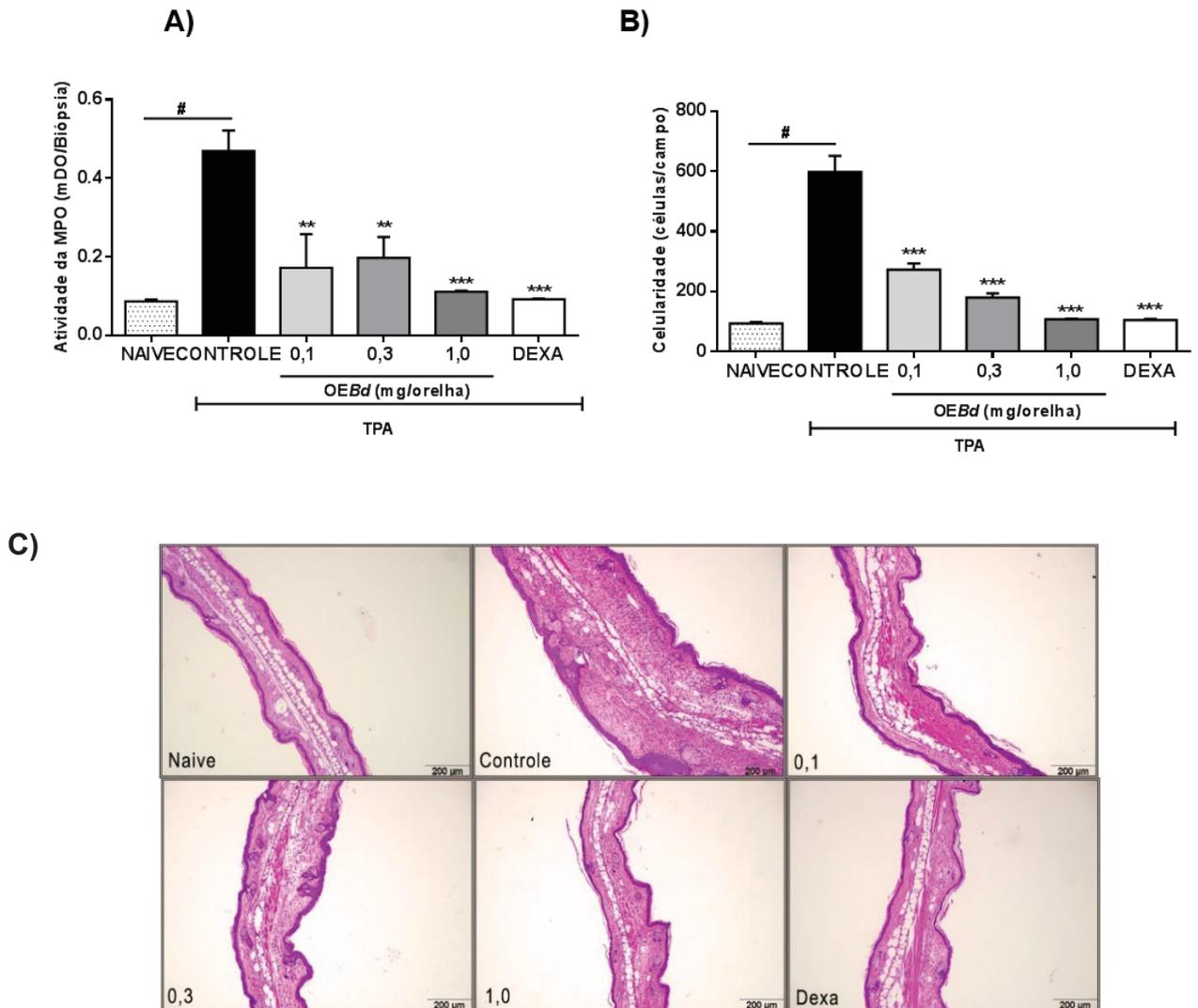


FIGURA 13 – Efeito do OEBd sobre a enzima MPO e sobre a migração celular em modelo de dermatite aguda induzida por TPA.

O processo inflamatório foi induzido pela aplicação tópica de 2,5 μg de TPA, inseridos em 20 μL de acetona. Os tratamentos foram diluídos em acetona e aplicados diretamente na orelha dos animais. Após 24h os tecidos foram coletados para análise enzimática (A) e histológica (B e C). A quantificação foi realizada através da contagem do número de células na derme, com aumento de 200x em cinco campos distintos de três cortes histológicos. Os símbolos (*) representam o nível de significância em comparação ao grupo controle: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e (#) em relação ao controle quando comparado ao Naive. As barras verticais representam a média \pm EPM ($n=3-6$). Os testes foram realizados por ANOVA de uma via seguido por *post-hoc* de Bonferroni.

5.2 EFEITO TÓPICO DO OEBd DERMATITE INDUZIDA POR AA

A aplicação do AA é um modelo de dermatite de contato que produz uma reação inflamatória imediata causando edema de orelha. A administração tópica de AA provocou um aumento na espessura da orelha 1 h após a aplicação (Figura 14).

As diferentes doses de OEBd foram capazes de inibir o edema em $46,0 \pm 5,1\%$ (0,3 mg/orelha) e $54,6 \pm 6,0\%$ (1,0 mg/orelha). A dose de 0,1 mg/orelha não causou alteração significativa (Figura 14). A indometacina (2 mg/orelha), utilizada como controle positivo, inibiu o edema em $55,1 \pm 5,9\%$ quando comparado ao grupo controle.

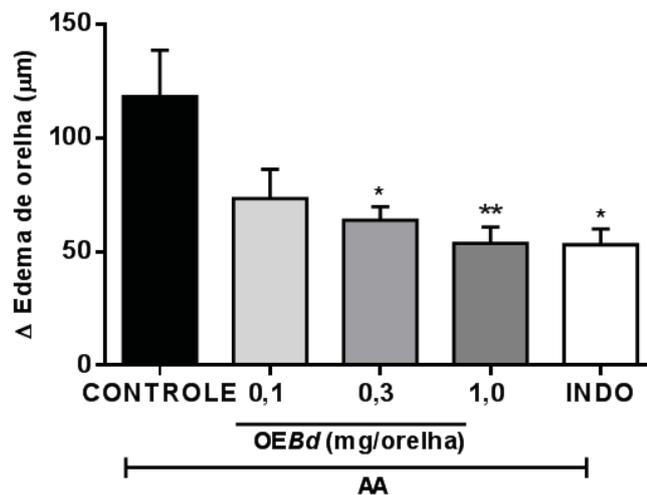


FIGURA 14 - O tratamento tópico com OEBd causa inibição do edema causado pelo AA

O processo inflamatório foi induzido pela aplicação tópica de 2,0 mg/orelha de AA. O OEBd e a indometacina foram diluídos em acetona e aplicados diretamente na orelha dos animais. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=6). Os símbolos (*) representam o nível de significância em comparação ao grupo controle: *p<0,05 e **p<0,01 analisados por ANOVA de uma via seguido por *post-hoc* de Bonferroni.

5.3 AÇÃO DO OEBd NO MODELO DE HIPERPROLIFERAÇÃO CAUSADA POR MÚLTIPLAS APLICAÇÕES DE TPA

As múltiplas aplicações de TPA promoveram um aumento significativo na espessura da orelha a partir do primeiro dia como visto na Figura 15. O tratamento tópico com OEBd causou redução do edema desde o sétimo dia até o último dia do experimento (9º dia) atingindo $61,4 \pm 5,5\%$ de inibição. O grupo controle positivo, dexametasona, apresentou inibição do edema ao longo do modelo, mostrando uma inibição máxima no dia 9 de $87,2 \pm 3,5\%$ em relação ao grupo controle.

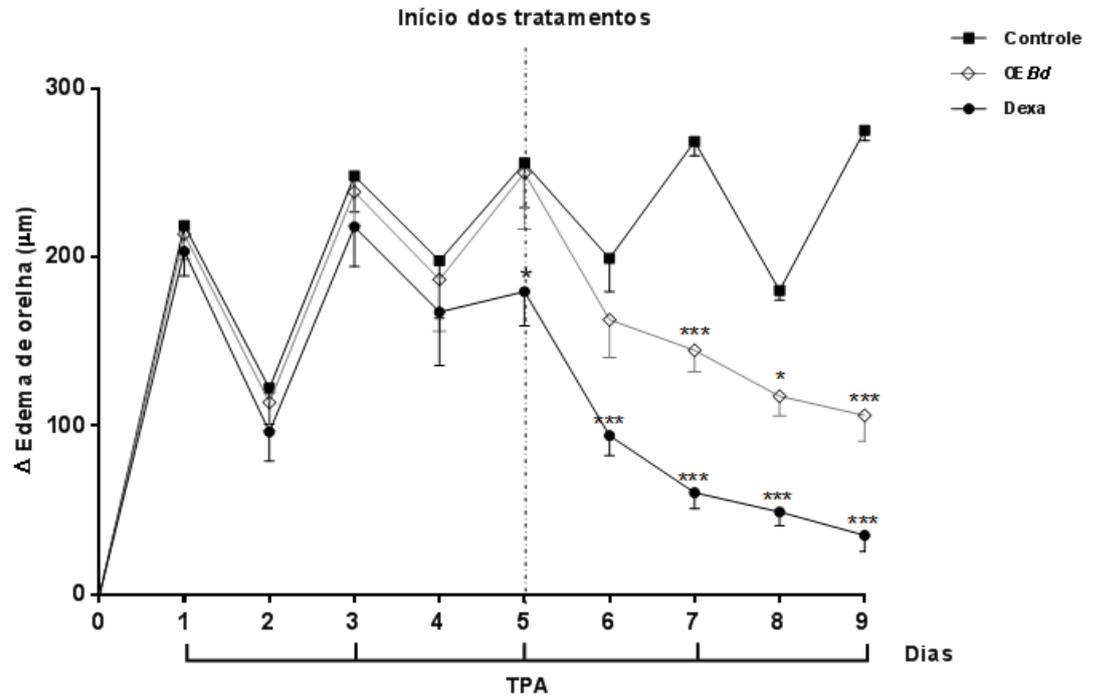


FIGURA 15 –Efeito de inibição da atividade edematogênica do TPA pelo tratamento crônico com OEBd.

O processo inflamatório foi induzido pela aplicação tópica de 2,5 μg /orelha de TPA em dias alternados, por 9 dias. O OEBd (1,0 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha) foram aplicados diretamente na orelha dos animais logo após o TPA. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=6). Os símbolos (*) representam o nível de significância em comparação ao grupo controle: *p<0,05; ***p<0,001. Os testes foram realizados por ANOVA de duas vias seguido por *post-hoc* de Bonferroni.

As múltiplas aplicações de TPA também causaram aumento significativo na atividade das enzimas MPO e NAG (Figura 16A e 16B). Novamente, o tratamento com OEBd (1,0 mg/orelha) e dexametasona (0,1 mg/orelha) foi capaz de reverter o aumento da MPO para os níveis basais. O mesmo efeito foi observado para a atividade da NAG, sendo igual a $85,5 \pm 4,7\%$ e $86,7 \pm 7,3\%$, para o OEBd e dexametasona respectivamente.

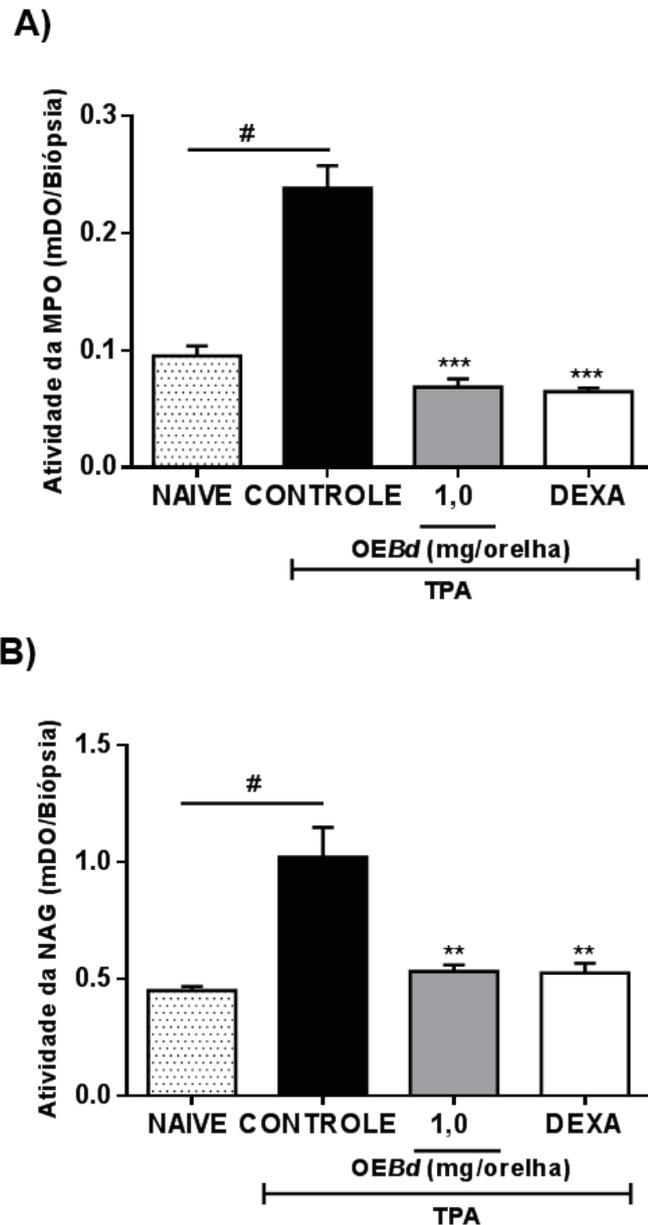


FIGURA 16 O tratamento com *OEBd* inibe atividade enzimática de MPO e NAG induzidas pelo tratamento repetido com TPA.

O processo inflamatório foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha), em dias alternados, por 9 dias. O *OEBd* e a dexametasona foram aplicados nas doses de 1,0 e 0,1 mg/orelha, respectivamente. Ao final do último dia, amostras da orelha foram retiradas com auxílio de um *punch* para posteriores análises. (A) Análise enzimática da atividade da MPO. (B) Análise enzimática de NAG. As barras verticais representam a média ± EPM (n=6). Símbolos (*) representam o nível de significância em comparação ao grupo controle: **p<0,01; ***p<0,001 e (#) em relação ao controle quando comparado ao Naive. Os testes foram realizados por ANOVA de uma via seguido por *post-hoc* de Bonferroni.

Conforme apresentado nas Figuras 17, a análise histológica demonstrou que o tratamento com OEBd inibiu a migração celular em $74,1 \pm 2,0\%$ e dexametasona em $95,3 \pm 1,5\%$ em comparação ao controle. Além disso, as múltiplas aplicações de TPA promoveram um aumento expressivo da espessura da epiderme, o qual foi revertido parcialmente pelo tratamento com o óleo essencial em $85,0 \pm 1,4\%$, e com dexametasona em $91,8 \pm 1,5\%$, quando comparado ao controle (Figura 17C).

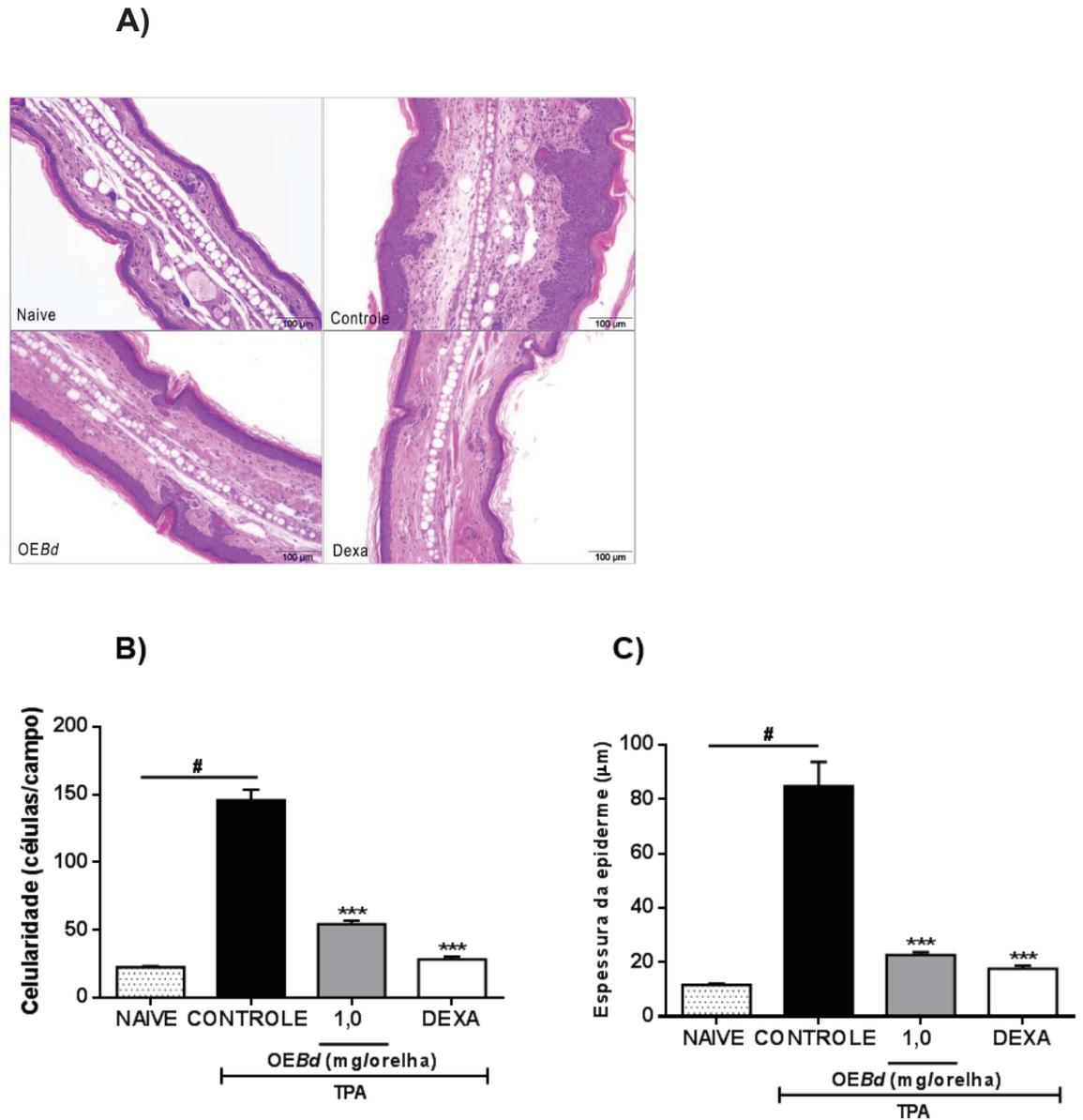


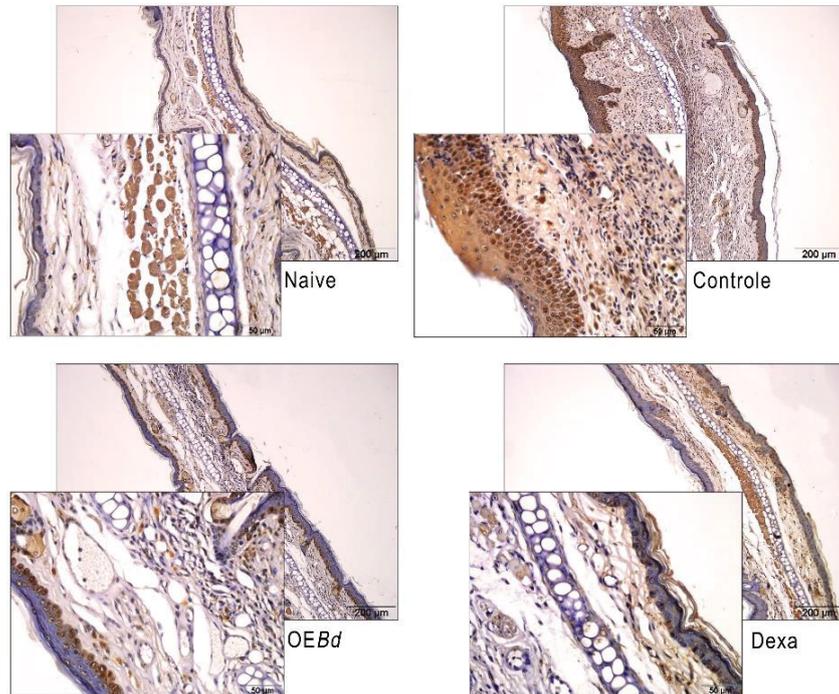
FIGURA 17 –Efeito do OEBd sobre a migração celular e espessura da epiderme analisados por histologia no modelo de aplicações repetidas de TPA.

O processo inflamatório foi induzido pela aplicação tópica de 2,5 µg de TPA, inseridos em 20µL de acetona por 9 dias em dias alternados. Os tratamentos foram diluídos em acetona e aplicados diretamente na orelha dos animais. Ao final do último dia do experimento os tecidos foram coletados para análise histológica. A quantificação foi realizada através da contagem do número de células na derme, com aumento de 200x em cinco campos distintos de três cortes histológicos (A) Fotos representativas de cortes histológicos. (B) Celularidade obtida através da contagem de células contra-coradas com H&E presentes na derme. (C) Espessura da epiderme obtida com auxílio do software Image G. As barras verticais representam a média ± EPM (n=6). Os símbolos (*) representam o nível de significância em comparação ao grupo controle: ***p<0,001 e (#) em relação ao controle quando comparado ao Naive. Os testes foram realizados por ANOVA de uma via seguido por *post-hoc* de Bonferroni.

5.1 EFEITO DO *OEBd* SOBRE A DIFERENCIAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE QUERATINÓCITOS INDUZIDOS PELA APLICAÇÃO REPETIDA DE TPA

Como podemos analisar na figura 18, as células positivas para PCNA na epiderme foram detectadas em todos os grupos como uma indicação de proliferação. Desse modo, o tratamento repetido com TPA crônico aumentou o número de queratinócitos em proliferação em toda a epiderme, não apenas na camada basal como visto no grupo Naive (Figura 18A). A aplicação repetida de TPA induziu a hiperproliferação (aumento de células da epiderme) em mais de 6x a espessura da epiderme ($627,7 \pm 186,52\%$) em comparação ao naive. Esse aumento na proliferação dos queratinócitos foi significativamente revertido pelo tratamento contínuo com *OEBd* em $74,3 \pm 2,4\%$ enquanto o tratamento com controle positivo provocou inibição de $93,1 \pm 1,3\%$ (Figura 18B).

A)



B)

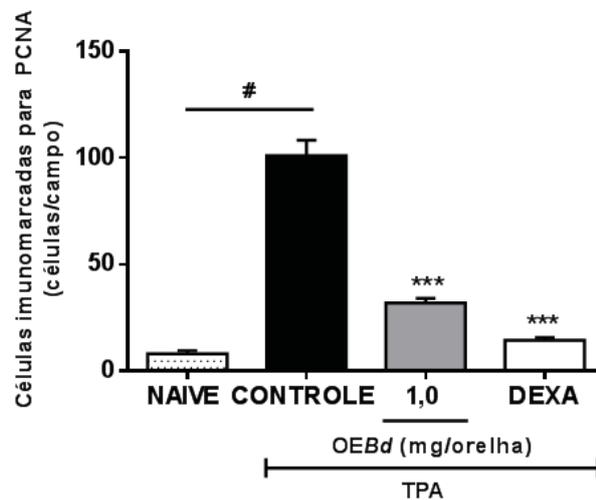
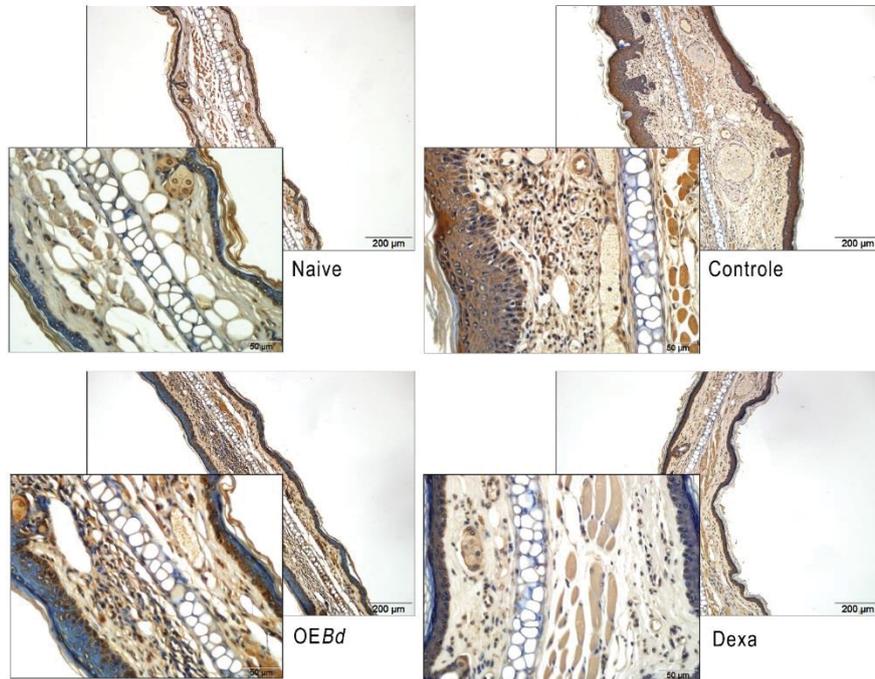


FIGURA 18 –Efeito do OEBd na proliferação de queratinócitos através de marcação imunohistoquímica para PCNA

O processo inflamatório foi induzido pela aplicação tópica de 2,5 µg de TPA, inseridos em 20µL de acetona por 9 dias em dias alternados. Os tratamentos foram diluídos em acetona e aplicados diretamente na orelha dos animais. Ao final do último dia do experimento os tecidos foram coletados para análise imunohistoquímica. (A) Fotos representativas dos cortes histológicos. (B) Contagem de células imunomarcadas para PCNA na epiderme dos cortes histológicos. As barras verticais representam a média ± EPM (n=6). Os símbolos (*) representam o nível de significância em comparação ao grupo controle: ***p<0,001 e (#) em relação ao controle quando comparado ao Naive. Os testes foram realizados por ANOVA de uma via seguido por *post-hoc* de Bonferroni.

Como pode ser observado nas fotos representativas (Figura 19A), a marcação imunohistoquímica para CK-14 demonstrou que a aplicação repetida de TPA levou ao aumento das células positivas para CK-14. Já o tratamento com *OEBd* causou redução de $76,8 \pm 2,3\%$ das células imunomarcadas e o controle positivo dexametasona em $83,5 \pm 1,3\%$ (Figura 19B).

A)



B)

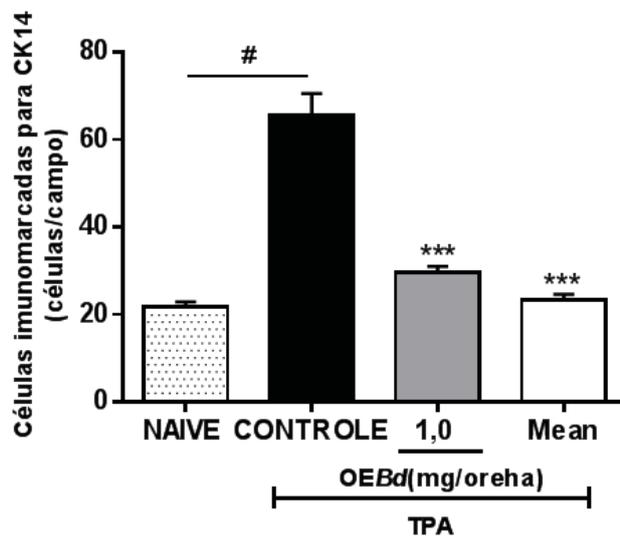


FIGURA 19 –Efeito do OEBd na diferenciação de queratinócitos através de marcação imunohistoquímica para CK-14.

O processo inflamatório foi induzido pela aplicação tópica de 2,5 μ g de TPA, inseridos em 20 μ L de acetona por 9 dias em dias alternados. Os tratamentos foram diluídos em acetona e aplicados diretamente na orelha dos animais. Ao final do último dia do experimento os tecidos foram coletados para análise imunohistoquímica. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=6). Os símbolos (*) representam o nível de significância em comparação ao grupo controle: ***p<0,001 e (#) em relação ao controle quando comparado ao Naive. Os testes foram realizados por ANOVA de uma via seguido por *post-hoc* de Bonferroni.

5.2 INVESTIGAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO TIPO CORTICOIDE DO OEBd

A fim de avaliar a atividade anti-inflamatória sistêmica do tratamento tópico com o OEBd, o experimento de TPA contra-lateral foi realizado com o tratamento sendo aplicado na orelha oposta ao agente inflamatório. Nesse cenário, o OEBd uma redução significativa no edema induzido por TPA de $46,0 \pm 4,7\%$ (Figura 20). A dexametasona também induziu redução ($77,4 \pm 3,5\%$) do edema.

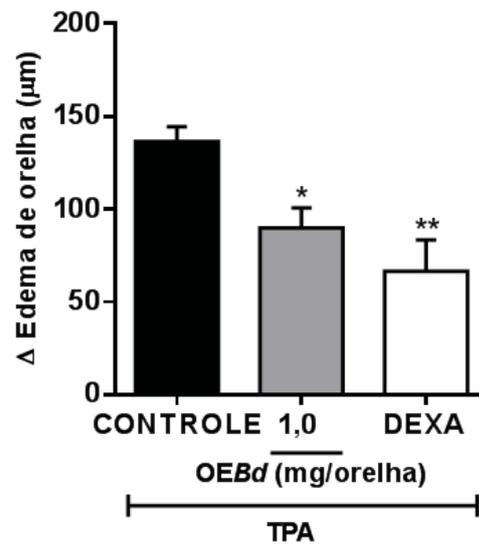


FIGURA 20 – Efeito antiedematogênico sistêmico do OEBd quando aplicado por via tópica.

O processo inflamatório foi induzido pela aplicação tópica de $2,5 \mu\text{g}$ de TPA, inseridos em $20 \mu\text{L}$ de acetona. Os tratamentos foram realizados na orelha oposta à orelha em que o TPA foi aplicado. O edema foi avaliado após 6h da indução do processo inflamatório. As barras verticais representam a média \pm EPM ($n=6$). Os símbolos (*) representam o nível de significância em comparação ao grupo controle: * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ analisados por ANOVA de uma via seguido por *post-hoc* de Bonferroni.

As múltiplas aplicações tópicas de dexametasona induziram redução na espessura da orelha (redução de $36,3 \pm 6,0 \mu\text{m}$) (Figura 21A). Diferentemente, a aplicação repetida do OEBd ($1,0\text{mg/orelha}$) não causou alteração significativa na espessura da orelha. Ainda, nenhuma mudança no peso de órgãos linfóides pelo OEBd foi detectada, como no baço, timo ou linfonodo auricular (Figura 21B, C, D e F). O efeito sistêmico da dexametasona foi observado pela redução do peso do baço em $73,1 \pm 3,0\%$ (Figura 21B), do timo em $84,7 \pm 2,1\%$ (Figura 21C) e do linfonodo auricular em $61,95 \pm 2,5\%$ (Figura 21D), quando comparado ao Naive. No entanto, não observamos diferença estatística no peso das adrenais, ou no peso corporal total com qualquer tratamento (Figuras 21E e 21F).

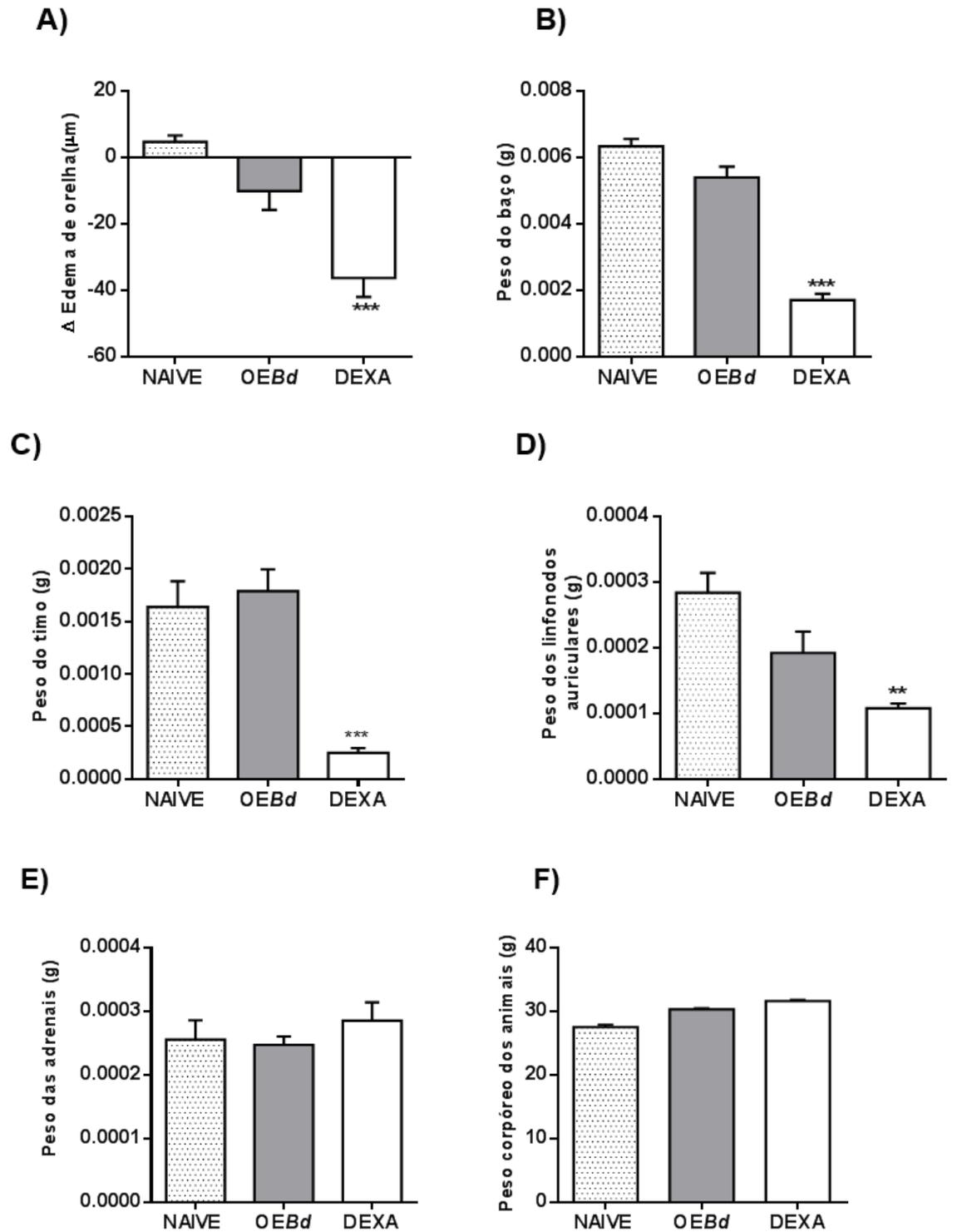


FIGURA 21 – Efeito da aplicação tópica repetida do OEBd sobre a pele e órgãos linfoides.

Os tratamentos com OEBd e Dexametasona foram realizados por 7 dias consecutivos, duas vezes ao dia. O edema da orelha foi avaliado antes do primeiro dia do experimento e ao final do último dia. Os animais foram pesados diariamente e no último dia do experimento foram eutanasiados para coleta dos órgãos descritos. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=6). Os símbolos (*) representam o nível de significância em comparação ao grupo controle: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ analisados por ANOVA de uma via seguido por *post-hoc* de Bonferroni.

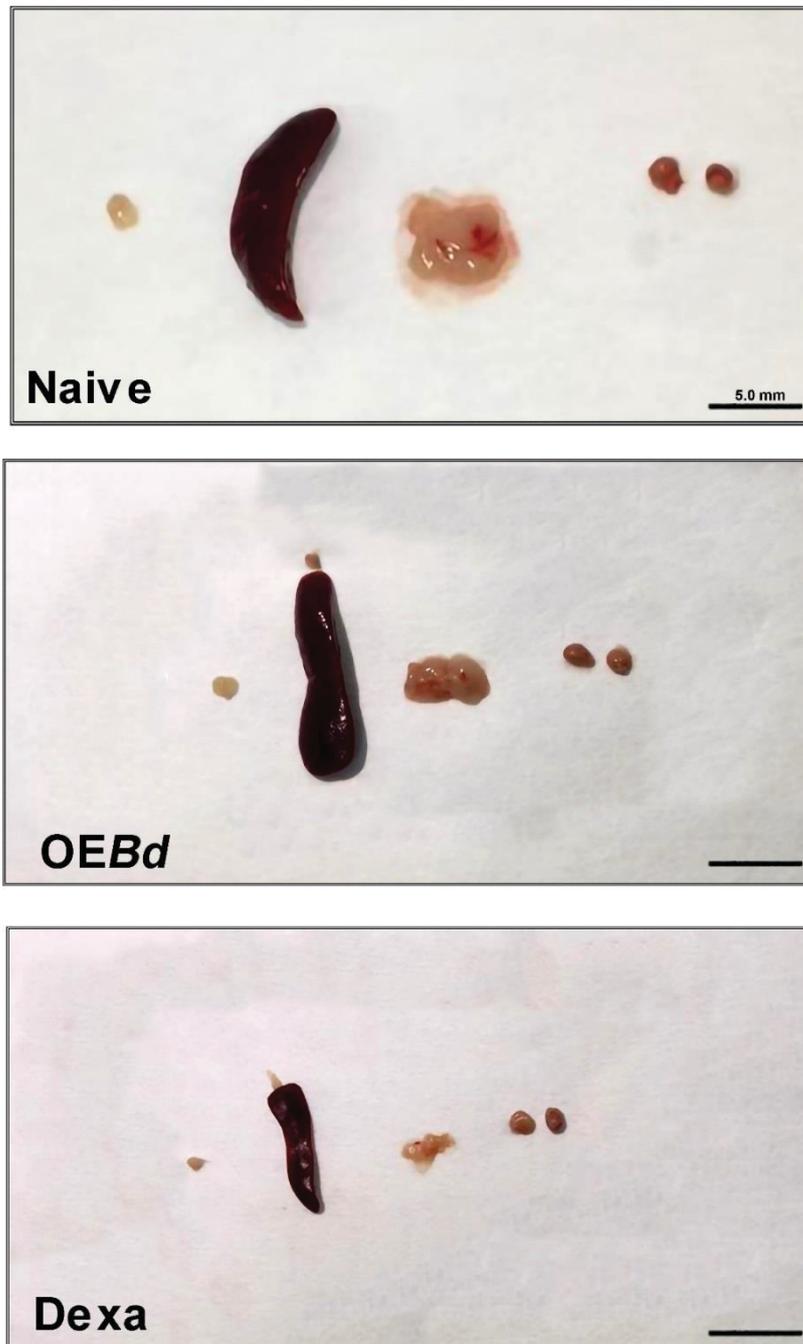


FIGURA 22 – Fotos representativas dos órgãos linfoides dos animais tratados repetidamente com *OEBd* ou Dexametasona.

Na sequência estão apresentados o linfonodo auricular, baço, timo e adrenais. Os tratamentos com *OEBd* e Dexametasona foram realizados por 7 dias consecutivos, duas vezes ao dia. Os animais foram eutanasiados ao final do tratamento para coleta dos órgãos. Escala: 5 mm.

5.3 INFLUÊNCIA DO OEBd NA AÇÃO DOS GLICOCORTICOIDES

Como mostrado na figura 23, o pré-tratamento com mifepristona (50 mg/kg, via subcutânea), não causou nenhuma alteração na formação de edema de orelha induzido pelo TPA. Entretanto, a aplicação tópica com OEBd (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg / orelha) tiveram seus efeitos inibitórios sobre o edema de orelha revertidos pela mifepristona, não apresentando significância quando comparado ao controle. Quando administrado apenas o veículo do antagonista (PEG400) o efeito inibitório do OEBd permaneceu em $40,5 \pm 6,7\%$ e da dexametasona em $98,8 \pm 3,0\%$, como visto nos resultados anteriores.

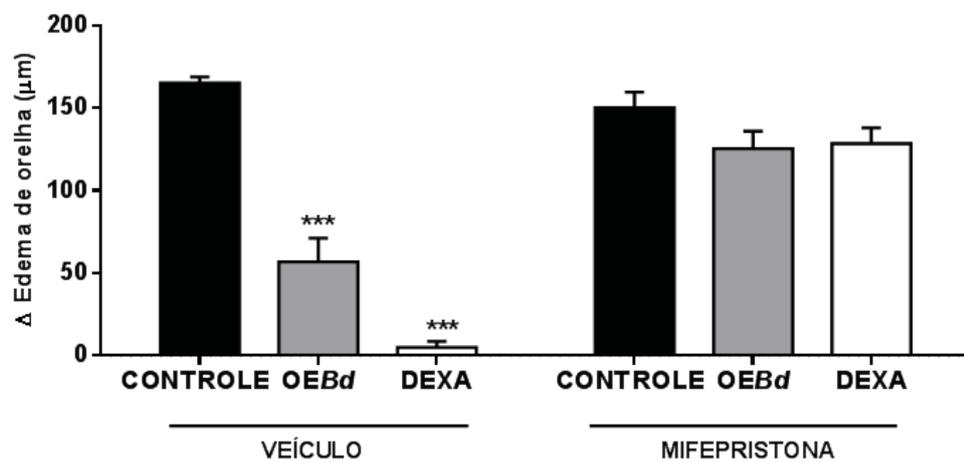


FIGURA 23 – Evidência para um possível mecanismo de ação do OEBd.

Os animais foram pré-tratados com o antagonista farmacológico de receptores glicocorticoides (mifepristona) ou seu respectivo veículo (PEG400), 30 min antes da indução do processo inflamatório. O processo inflamatório foi induzido pela aplicação de TPA 2,5 μg/orelha. Os tratamentos com OEBd e Dexametasona foram realizados logo após o tratamento com o agente inflamatório. O edema da orelha foi avaliado após 6h da indução com auxílio de micrometro digital. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=12). Os símbolos (*) representam o nível de significância em comparação ao grupo controle: ***p<0,001 e analisados por ANOVA de duas vias seguido por *post-hoc* de Bonferroni.

Resultados semelhantes foram obtidos na análise de MPO, onde o tratamento com OEBd (1,0 mg/orelha) reduziu a atividade da enzima em $68,6 \pm 9,7\%$, enquanto a dexametasona reduziu em $95,9 \pm 3,9\%$ (Figura 24). Porém, quando realizado o pré-tratamento com mifepristona esse efeito foi significativamente revertido.

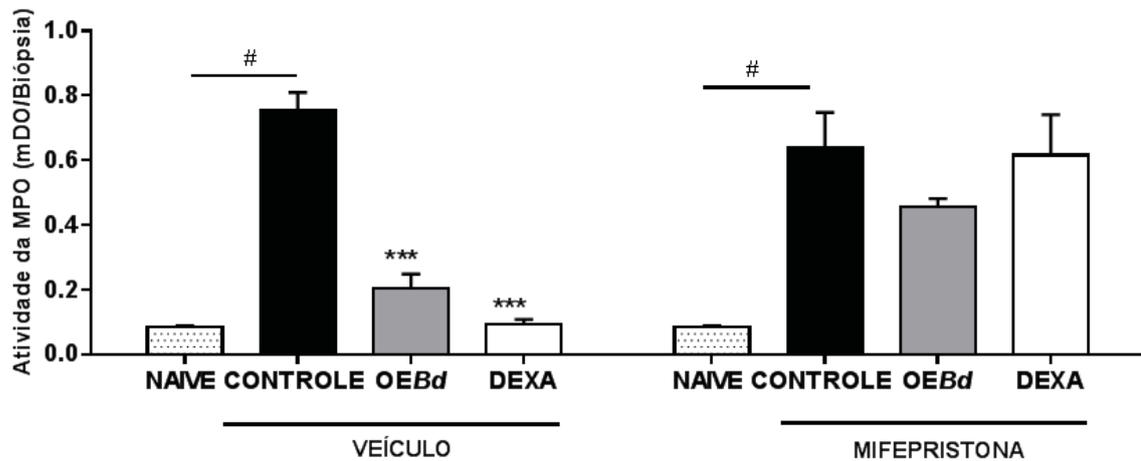


FIGURA 24 – Influência do antagonista de glicocorticoide no efeito inibitório do OEEd sobre infiltração de neutrófilos.

Os animais foram pré-tratados com o antagonista farmacológico de receptores glicocorticoides (mifepristona) ou seu respectivo veículo (PEG400), 30 min antes da indução do processo inflamatório. O processo inflamatório foi induzido pela aplicação de TPA 2,5 µg/orelha. Os tratamentos com OEEd e Dexametasona foram realizados logo após o tratamento com o agente inflamatório. 24h após o processo descrito, os animais foram eutanasiados para coleta dos tecidos da orelha para análise enzimática. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=6). Os símbolos (*) representam o nível de significância em comparação ao grupo controle: ***p<0,001 e analisados por ANOVA de duas vias seguido por *post-hoc* de Bonferroni.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A *B. dracunculifolia* é uma planta nativa no Brasil conhecida por suas atividades medicinais e por seu uso tradicional pela população. As ações desta planta e de seu produto derivado, o própolis verde, são relatadas na literatura desde meados de 2002 quando suas atividades começaram a ser descritas, estimulando novos estudos com a intenção de buscar possíveis aplicações terapêuticas para ambos (BANKOVA et al., 1999; NAGATANI; WARASHINA; NORO, 2002).

No presente trabalho, observamos que o OE*Bd* possui uma rica composição. Dentre os 31 compostos encontrados, destacam-se sesquiterpênicos, fenóis e taninos. Alguns estudos previamente publicados demonstraram que a fitoquímica de extratos hidroetanólicos obtidos através dessa planta apresentam uma composição semelhante ao óleo essencial utilizado em nosso estudo, da mesma forma que existe uma semelhança fitoquímica bastante acentuada em relação ao OE*Bd* com o própolis verde, derivado da planta (PARK et al., 2004). Como descrito anteriormente, o gênero *Baccharis* possui diversas espécies com diferentes morfologias e aplicações terapêuticas ou comerciais espalhados pelo continente, por esse motivo, podem facilmente apresentar diferenças em seus metabólitos secundários. Apesar deste fato, Ascari et al. (ASCARI et al., 2019) encontrou um perfil fitoquímico semelhante em um óleo essencial obtido através de folhas de *B. punctulata*, muito por isso observamos um resultado semelhante no modelo de inflamação induzido por TPA.

Outras espécies de *Baccharis* já foram descritas por suas ações anti-inflamatórias, como *B. trimera*. Neste estudo o tratamento com os extratos aquosos da planta demonstrou melhorar o sistema de defesa antioxidante e restaurar equilíbrio de ROS/NO que é alterado no processo de lesão hepática induzido por altas doses de acetaminofeno, além disso, o extrato da *B. trimera* demonstrou diminuir a expressão de genes responsáveis pela produção de ROS em neutrófilos (CRUZ PADUA et al., 2014). Esses dados corroboram com indícios encontrados por Figueiredo-Rinhel et al. (FIGUEIREDO-RINHEL et al., 2017) onde extratos hidroetanólicos de *B. dracunculifolia* modulam seletivamente as funções efetoras de neutrófilos humanos, inibindo principalmente a atividade de enzimas ligadas a processos de estresse oxidativo como a MPO. Além disso, um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa demonstrou que o extrato das folhas de *B. illinita*, popularmente conhecida como “chá ventura” também apresentou efeitos anti-

inflamatórios em modelos de edema de orelha induzidos por TPA (BOLLER et al., 2010).

O modelo de aplicação única de TPA na pele é um método bastante utilizado para detectar possíveis efeitos anti-inflamatórios de compostos. O TPA, por sua vez promove um potente efeito irritante, que provém de uma ativação direta da proteína quinase C (PKC), seguida de ativação da fosfolipase A2 (PLA2), ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX). Como consequência, alguns eventos intracelulares posteriormente desencadeados são mediados através da produção e ativação de eicosanóides da via das proteínas quinases ativadas por mitógeno, assim como um de seus principais fatores de transcrição, o TNF- α . Esse fator é um dos responsáveis pela manutenção da permeabilidade vascular, fator crucial para permitir a migração das células do sistema imune, mediando os eventos vasculares e clássicos do processo inflamatório. Nesse processo, a IL-1 β também é secretada e passa por uma via que resultará na transcrição de uma série de genes que levarão à expressão de moléculas importantes para o processo inflamatório, como moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas. O resultado é o estabelecimento de edema, eritema e infiltração leucocitária (MURAKAWA et al., 2006; SONG et al., 2008; XIAN et al., 2018). Visto isso, o modelo de aplicação aguda de TPA é bastante simples e reprodutível tendo em vista que medeia eventos fisiológicos interessantes para serem avaliados numa investigação inicial.

Com isso, pudemos observar que o *OEBd* se apresentou eficaz em todos os parâmetros que analisamos neste modelo, ou seja, a inibição da formação do edema, da migração leucocitária avaliada pela atividade da MPO e pela análise histológica. No edema, o óleo essencial foi eficaz em todas as doses testadas e inibiu quase completamente a resposta ao TPA na dose de 1 mg/orelha em ambos os tempos testados (6 h e 24 h). Isso demonstra que o óleo essencial obtido das folhas da planta apresenta atividade antiedematogênica importante quando utilizado topicamente.

No processo inflamatório agudo uma das primeiras e mais importantes células que migram para o tecido inflamado são os neutrófilos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Desta maneira, para avaliar indiretamente a presença desse tipo celular, realizamos a quantificação da atividade enzimática da MPO, uma enzima presente nos grânulos destas células (STANLEY et al., 1991). Logo, a atividade da MPO é normalmente usada como um indicativo indireto de infiltração de granulócitos no local da inflamação (AJUEBOR; SINGH; WALLACE, 2000). Os granulócitos são

importantes mediadores da inflamação, uma vez que os neutrófilos representam parte importante do processo inflamatório agudo em diferentes tipos de dermatites por meio da ativação de outras células, como os queratinócitos e as células T (TERUI, 2000).

Os neutrófilos são células capazes de modular muitos aspectos da imunidade inata e adaptativa. São células conhecidas por serem os primeiros leucócitos a chegar no local da infecção, onde exercem papéis fundamentais na eliminação de patógenos, seja por sua ação como um fagócito, que leva a sua posterior morte ou por liberação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (*neutrophil extracellular traps*, NETs). Uma rede de NETs é criada quando um neutrófilo em morte expõe os componentes do seu núcleo, como cromatina, MPO, elastina, entre outros elementos no ambiente externo. Isso acontece por um tipo de morte especializada conhecida como netose. Sabe-se que esse processo facilita a captura de maior quantidade de patógenos assim como promove a facilitação da fagocitose mediada por macrófagos e até mesmo por outros neutrófilos que seguirão o processo de morte celular programada (apoptose) (ODOBASIC; KITCHING; HOLDSWORTH, 2016; HUANG et al., 2019). No entanto, através da liberação de alguns desses mediadores inflamatórios, os neutrófilos também podem contribuir para lesão tecidual e danos a órgãos em doenças autoimunes ou doenças inflamatórias (SCHULTZ; KAMINKER, 1962). A MPO, como demonstrado por alguns autores, aparenta ser a principal proteína dos grânulos de neutrófilos e a mais crucial para as funções de neutrófilos descritas acima (ODOBASIC; KITCHING; HOLDSWORTH, 2016). Com isso, tornou-se importante observar quais seriam as ações do tratamento com o *OEBd* na atividade dessa enzima.

Nossos resultados demonstraram que o óleo foi capaz de reduzir a atividade da MPO em todas as doses testadas (0,1, 0,3 e 1,0 mg/orelha). Como mencionado, os neutrófilos têm um papel importante no processo inflamatório, e parte de suas ações está relacionada à capacidade da MPO de produzir espécies reativas de oxigênio. Simões et al. (SIMÕES et al., 2004) observaram que extratos de própolis verde com maior presença de flavonoides apresentam maior atividade antioxidante nos neutrófilos.

Ainda, para confirmar que o *OEBd* é capaz de inibir a migração celular realizamos a análise histológica. Os cortes histológicos foram obtidos após a indução do processo inflamatório com TPA, onde a contagem total de leucócitos demonstrou a capacidade do óleo em inibir a infiltração celular. Dada a importância da contagem

de leucócitos, representados principalmente por neutrófilos, em doenças inflamatórias de pele (SENRA et al., 2019), mais uma vez nossos resultados apontam para o potencial terapêutico do *OEBd*.

A resposta inflamatória da pele produzida pelo TPA difere, em termos de mecanismo, da resposta desencadeada pelo modelo do AA (Figura 25). Classicamente, este último é usado para identificar possíveis inibidores de LTB₄, pois é a parte da cascata de ativação que difere entre os modelos. Assim, utiliza-se controles positivos diferentes para estes experimentos. Visto que o modelo do AA depende da atividade da COX-2 para o início da ação, a indometacina é o controle positivo neste experimento. Enquanto no modelo do TPA, a dexametasona, por diminuir não só a atividade da COX-2 como também toda a cascata envolvendo PKC e MAPK/ERK, é o controle positivo utilizado. Com isso, elimina-se algumas possibilidades para os mecanismos de ação da substância teste. Substâncias que inibem a atividade de COX-2 e 5-LOX reverterem a formação tanto no modelo do TPA quanto no do AA. Por outro lado, antagonistas do receptor de LTB₄ só o fazem no modelo de AA, não revertendo eficazmente o edema de orelha induzido por TPA (RAO et al., 1993; GÁBOR, 2000; OTUKI et al., 2005).

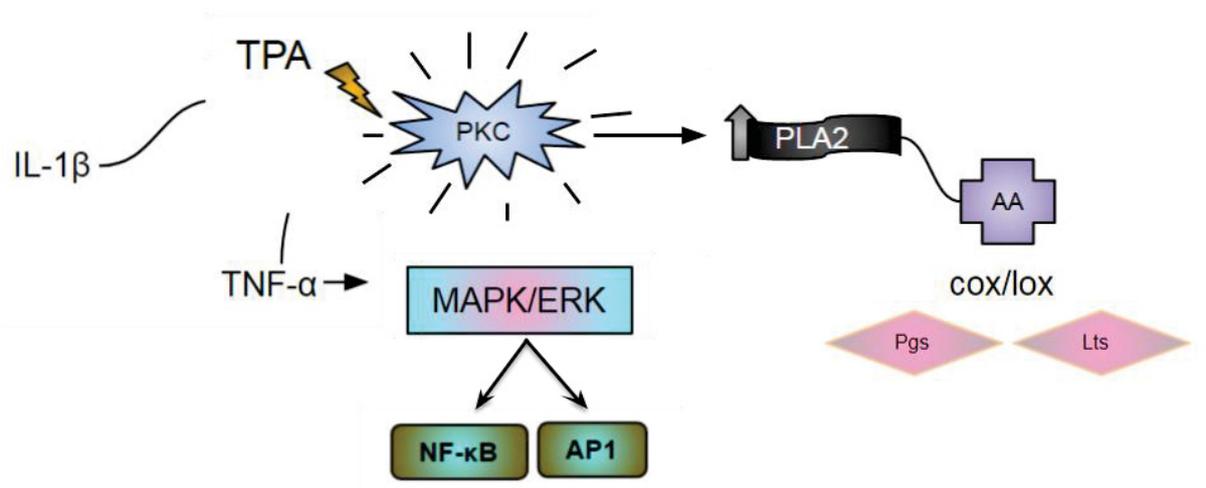


FIGURA 25 – Via de sinalização do TPA e do AA na pele.

TPA ativa a via da PKC e induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, culminando na ativação da via da MAPK/ERK, responsáveis pela ativação de genes pró-inflamatórios. A ativação da via da PKC também induz a atividade da PLA2 e aumento da produção de AA.

Fonte: O Autor.

Com isso, podemos utilizar o modelo de edema de orelha induzido por AA com o intuito avaliar duas questões, a primeira, se o *OEBd* atuaria em um diferente modelo experimental de dermatite aguda, assim como avaliar um possível mecanismo de ação de algum de seus compostos referente a cascada dos eicosanóides. Assim, notamos que o foi eficaz em inibir o edema de orelha induzido pelo AA, da mesma forma em que o faz no modelo de TPA. Portanto, isso pode ser devido a qualquer ação a baixo da via da PLA2, sendo necessária com mais afinco a investigação de um mecanismo de ação em potencial (RAO et al., 1993).

Uma vez que observamos que o *OEBd* foi efetivo em modelos de dermatite aguda, nossa intenção foi avaliar seus efeitos em um modelo de inflamação crônica. A psoríase é uma doenças inflamatórias crônicas da pele mais comum, caracterizada pela proliferação excessiva de queratinócitos epidérmicos (LOWES; BOWCOCK; KRUEGER, 2007). Para mimetizar esse evento da psoríase utilizamos o modelo de múltiplas aplicações de TPA onde observa-se a hiperproliferação epidermal, com marcado desenvolvimento de acantoses e intensa infiltração de leucócitos na derme e epiderme, conforme ocorre na pele psoriática em humanos (KULKARNI et al., 2015). O tratamento nesse experimento começa apenas no quinto dia de protocolo a fim de avaliar a ação do óleo essencial em uma inflamação pré-estabelecida.

A inflamação crônica difere da inflamação aguda em diversos aspectos. Na psoríase, por exemplo, sabe-se que potencialmente há o envolvimento no eixo da IL-23/Th17, tão importante para a patogênese dessa doença crônica. A expressão de algumas proteínas específicas na pele psoriática parece estar relacionada com a infiltração de células dendríticas plasmocitoides na derme e epiderme que liberam IFN- α , conseqüentemente ativando células dendríticas mieloides, que se localizam nos gânglios linfáticos onde apresentam antígenos e liberam sinais co-estimulatórios e citocinas (IL-6, IL-12, IL-23). Esses sinais induzem a diferenciação de células T naive em células Th efetoras, que migram para a derme e epiderme onde interações dinâmicas e entre várias células e vários tipos de citocinas causam proliferação contínua dos queratinócitos, assim como recrutamento contínuo de células T (COATES et al., 2016).

Observamos em nosso estudo que o *OEBd* foi efetivo inibindo todos os parâmetros avaliados no modelo de inflamação crônica. A redução do edema foi significativa a partir do sexto dia até o final do experimento. A aplicação repetida de TPA causou intenso aumento na migração celular, e mais uma vez o *OEBd* inibiu a

migração dos neutrófilos, detectados indiretamente pela redução na atividade enzimática de MPO, como observado nos experimentos anteriores. Além disso, neste modelo realizamos também a avaliação da atividade da NAG, com o intuito de identificar indiretamente a presença de macrófagos, que estão mais presentes no processo inflamatório crônico (MURAKAWA et al., 2006). Os macrófagos são células importantes em diversos tipos de lesão de pele e, particularmente, nos processos crônicos. Durante a resolução do processo inflamatório agudo, há uma transição na população de macrófagos do estado M1, pró-inflamatório, para o M2, anti-inflamatório. Em lesões crônicas, porém, há um prejuízo também nesta transição de estado celular. Em feridas e lesões não resolutivas, como as úlceras diabéticas e úlceras de pressão, o ambiente local permanece inflamado, prejudicando o fechamento do mesmo (KRZYSZCZYK et al., 2018). Parte da complexa patogênese de doenças inflamatórias crônicas de pele envolve macrófagos que, também pela presença de citocinas como $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ da resposta Th1, e IL-17 da resposta Th17, encontram-se no estado M1 e, assim, contribuem para a cronificação do processo patológico, (VAN LINTHOUT; MITEVA; TSCHÖPE, 2014). Como medida da quantidade de macrófagos no tecido, avaliamos a atividade de NAG, onde o óleo essencial reduziu os níveis deste marcador, o que indica que possivelmente estaria diminuindo a quantidade de macrófagos no tecido inflamado. Este efeito também foi confirmado pela quantificação da celularidade em cortes histológicos, onde o óleo praticamente aboliu a presença de células dérmicas contra-coradas com hematoxilina e eosina.

Analisando os cortes histológicos, o tratamento repetido com o *OEBd* também interferiu no aumento da espessura da epiderme, um evento diretamente relacionado à hiperproliferação dos queratinócitos causada pelo tratamento contínuo com TPA. Esse efeito sobre a proliferação foi demonstrado pela imunomarcagem para o PCNA, um antígeno nuclear de células em proliferação. Esta proteína está associada a hiperproliferação e diferenciação de queratinócitos. Em doenças inflamatórias de pele, a desregulação da resposta Th1 dependente de $IFN-\gamma$ causa um aumento na proliferação de queratinócitos e, então, encontra-se a proteína PCNA em níveis aumentados (BATA-CSORGO et al., 1995). Nossos resultados demonstraram uma diminuição dos níveis de PCNA no tecido, o que poderia implicar numa possível melhora nesta resposta.

Em se tratando da hiperproliferação de queratinócitos, diversas células participam deste evento, crucial na patogênese de doenças inflamatórias proliferativas

como a psoríase. Brevemente, DCs da região de lesão permanecem na região ou migram para órgãos linfoides próximos quando ativadas e liberam citocinas pró-inflamatórias da resposta Th1 como TNF α e IL-12, e da resposta Th17 como IL-23, o que leva a ativação de células T helper. O acúmulo de células T na região aumenta ainda mais a concentração local destas citocinas além de IFN γ , IL-22, e IL-17A. Neste ambiente a ativação de queratinócitos é exacerbada e estabelece-se um ciclo de retroalimentação que culmina na hiperproliferação destas células. Na psoríase isto manifesta-se como as placas descamativas características da doença (VAN DER FITS et al., 2004; ZHANG, 2019).

Nesse sentido, nossos dados corroboram com um estudo realizado para analisar diferentes marcadores de diferenciação e ciclos celulares, onde foi observado aumento no número de células positivas para PCNA nos queratinócitos dos tecidos com psoríase (ALBANESI; DE PITÀ; GIROLOMONI, 2007). Tendo *OEBd* diminuído a expressão deste marcador, reforça-se ainda mais o seu potencial terapêutico, levando-se em conta, ainda, as demais vantagens observadas, como menor perfil de efeitos adversos locais e potencial menor toxicidade que um dos agentes terapêuticos já utilizados para o tratamento, os corticoides. Nossos resultados mostraram que o óleo essencial aplicado topicamente no modelo de inflamação crônica diminuiu a expressão de PCNA na camada basal da epiderme, indicando inibição do aumento da proliferação epidérmica.

Além disso, como evidenciado em nosso experimento crônico com TPA, o *OEBd* reduziu o número de células positivas para CK-14, outro marcador de proliferação de queratinócitos que está aumentado na resposta Th17 desregulada, como detalhado acima. Este marcador é uma citoqueratina do tipo 1 expressa em queratinócitos em proliferação na camada basal da epiderme. Na psoríase, por exemplo, é um dos marcadores encontrados em níveis elevados na pele lesionada (ZHANG; YIN; ZHANG, 2019). Isto corrobora os achados e reforça o potencial do *OEBd* no tratamento de afecções hiperproliferativas cutâneas.

É importante ressaltar que apenas doenças agudas de pele são tratadas adequadamente e com sucesso. O mesmo não acontece com doenças inflamatórias crônicas como a psoríase e dermatite atópica. Muito disto se dá devido a suas origens etiológicas serem complexas e o processo patológico não ser bem elucidado. Por esse motivo, para a maioria das doenças crônicas de pele a principal escolha terapêutica é a aplicação tópica de corticosteroides (CALOU et al., 2008; LAM; POLIFKA; DOHIL,

2008). Até aqui, nossos resultados demonstram que *OEBd* tem eficácia comparável à dexametasona na reversão do processo inflamatório nos modelos testados. Também similar à dexametasona, a aplicação tópica de *B. dracunculifolia* foi capaz de inibir a formação de edema induzido por TPA em modelo de tratamento contralateral, indicando um possível efeito sistêmico de seu óleo essencial.

Esse efeito sistêmico em terapia tópica é bastante comum com os medicamentos glicocorticoides e é também parte das razões pelas quais eles apresentam alguns dos seus importantes efeitos adversos (PAPIER; STROWD, 2018). O experimento agudo com TPA e tratamento contra-lateral nos indica brevemente que os constituintes ativos presentes no óleo essencial estão permeando a pele e atingindo a circulação sistêmica em concentração suficiente para apresentar eficácia. Por esse motivo, passamos a verificar se o óleo está agindo pelas vias do receptor de glicocorticoide e se causa efeitos semelhantes em órgãos do sistema imune. Para isso, utilizamos o antagonista específico de glicocorticoides, a mifepristona (MENDES et al., 2016; GOLIER; YEHUDA, 2018). Ao investigar esse possível mecanismo de ação, observamos que o grupo pré-tratado com mifepristona, teve os efeitos inibitórios do *OEBd* observados até aqui, completamente abolidos. Como esperado, o mesmo efeito da mifepristona foi observado para a Dexametasona (droga que atua nos receptores glicocorticoides e serve como nosso controle positivo do estudo). Esse resultado nos permite considerar que o óleo essencial provavelmente está agindo via ativação desses receptores nucleares.

Por muito tempo corticosteroides tópicos foram a primeira linha de terapia para tratamento de doenças cutâneas, porém, seu uso prolongado está associado a efeitos indesejados que podem incluir atrofia cutânea, estrias longas e de forma geral diversas alterações na estrutura da pele que causam desestruturação da barreira física que ela representa. Mesmo quando aplicados por via tópica os corticoides ganham a corrente sanguínea, afetando o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Assim, o agonismo prolongado dos receptores nucleares glicocorticoides passa a exercer efeito de feedback negativo, induzindo uma redução nos mecanismos endógenos de controle da inflamação. Estes efeitos geram preocupações constantes em profissionais de saúde, assim como em pacientes ou cuidadores, levando a uma falta de adesão a esse tipo de terapia (SIEGFRIED; JAWORSKI; HEBERT, 2013). A terapia com glicocorticoides é normalmente associada à ativação de sistemas proteolíticos e alteração na deposição de proteínas da matriz extracelular e, por isso, o tratamento

com essa classe medicamentosa normalmente induz atrofia da pele, ou alterações nos órgãos linfóides, que perdem tamanho e/ou peso e capacidade funcional (WANG et al., 2016).

Embora tenhamos encontrado uma eficácia sistêmica para o *OEBd* em relação a dexametasona, assim como um mecanismo através da via dos glicocorticoides, nenhum efeito similar na espessura da pele, no peso do baço, timo, linfonodos da auriculares, da glândula adrenal, ou mesmo no peso corpóreo dos animais foi verificado, como normalmente é influenciado pelos glicocorticoides, sendo observado diferença estatística para dexametasona em relação ao Naive em alguns desses parâmetros (atrofia cutânea medida pelo edema de orelha, peso do timo e baço, e linfonodos auriculares). Esse resultado nos permite destacar uma possível segurança da terapia com O *OEBd*, especialmente por curtos períodos de tempo, ainda que sejam necessárias muitas outras metodologias para comprovação da mesma, e nos permite também destacar essa planta medicinal como um possível agente terapêutico para doenças inflamatórias da pele, confirmando seu uso na medicina tradicional.

O Brasil é um país com uma diversidade botânica riquíssima e extensão territorial vasta, o que facilita que tenhamos a propagação de diversas espécies capazes de se adaptar a climas variados. Diversos fatores alicerçam o uso dos medicamentos fitoterápicos na sociedade atual, seja por forte crescimento do ambientalismo, um assunto que vem tomando proporções cada vez maiores, ou por intervenções de saúde com abordagens mais naturais, que atualmente ganham força nas comunidades ao redor do mundo. Ainda, a fitoterapia é considerada essencial ao sistema primário de saúde e um dos sistemas complementares mais utilizados por diversas culturas. É importante ressaltar que o presente trabalho demonstrou a atividade do *OEBd*, uma espécie bastante utilizada na medicina tradicional local, porém cuja utilização provém de seu produto derivado, o própolis verde, ou proveniente da fervura das folhas da planta por ingestão de chá (BACHIEGA et al., 2013; RAMOS CAMPOS et al., 2016).

Como descrito anteriormente, a utilização de fitoterápicos em formas mais próximas às obtidas naturalmente, como extratos brutos ou óleos essenciais de fácil extração, podem ser uma vantagem sobre a utilização de um composto isolado de uma planta. O ideal é que a produção de um fitoterápico exija menor custo e maior viabilidade quando comparado a um produto isolado, que por sua vez, muitas vezes

exige alta complexidade para isolamento e síntese. Neste sentido, o uso popular da planta *in natura*, dada a demonstração de sua eficácia, acaba sendo uma alternativa ainda mais viável para o tratamento utilizando-se produtos naturais. Além disso, compostos isolados comumente atuam em receptores específicos, onde poderia estar sendo perdida a capacidade de sinergismo de compostos que possam atuar em diversos alvos moleculares (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Ainda, esse estudo teve como objetivo ressaltar a importância do cultivo e melhora do aproveitamento de uma espécie nativa brasileira, com distribuição nacional e forte interesse comercial e apícola, para utilização em esquemas terapêuticos de doenças inflamatórias da pele, além de comprovar a eficácia de seu uso tradicional.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Nossos dados sugerem que o óleo essencial obtido de folhas de *B. dracunculifolia* apresenta ação anti-inflamatória quando usado por via tópica. O OEEd apresentou importante ação anti-inflamatória e anti-hiperproliferativa em modelo que simula a psoríase. O efeito anti-inflamatório tópico do óleo essencial parece depender de receptores glicocorticoides, porém o uso por curto período não causou efeitos colaterais relacionados à imunossupressão, como ocorre com os agonistas desses receptores. Nesse sentido, nosso estudo apresenta pela primeira vez a eficácia tópica do óleo essencial obtido da principal fonte da própolis verde brasileira, *B. dracunculifolia*, em modelos de inflamação da pele. Além disso, aqui confirmamos o uso popular desta planta medicinal tão difundida no nosso país, demonstrando um breve perfil de segurança relacionado ao seu uso por via tópica em modelos de inflamação de pele.

Portanto, os resultados aqui apresentados corroboram com o uso popular desta planta na inflamação, mostrando que o conhecimento tradicional pode representar um alvo importante para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos.

REFERÊNCIAS

ABDULKHALEQ, L. A. et al. **The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review***Veterinary World*, 2018. .

AGA, H. et al. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 945–946, 1 jan. 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1271/bbb.58.945>>.

AJUEBOR, M. N.; SINGH, A.; WALLACE, J. L. Cyclooxygenase-2-Derived Prostaglandin D(2) Is an Early Anti-Inflammatory Signal in Experimental Colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 279, n. 1, p. G238-44, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10898767>>.

ALAVI, A. et al. Wound-Related Allergic/Irritant Contact Dermatitis. **Adv Skin Wound Care**, v. 29, n. 6, p. 278–286, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27171256>>.

ALBANESI, C.; DE PITÀ, O.; GIROLOMONI, G. Resident Skin Cells in Psoriasis: A Special Look at the Pathogenetic Functions of Keratinocytes. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 6, p. 581–588, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18021896>>.

ASCARI, J. et al. Chemical Composition, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of the Essential Oils from Male and Female Specimens of *Baccharis Punctulata* (Asteraceae). **J Ethnopharmacol**, v. 234, p. 1–7, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30660710>>.

AUSTIN, L. M. et al. The majority of epidermal T cells in psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon- γ , interleukin-2, and tumor necrosis factor- α , defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: A type 1 differentiation bias is al. **Journal of Investigative Dermatology**, 1999.

BACHIEGA, T. F. et al. Immunomodulatory/Anti-Inflammatory Effects of *Baccharis Dracunculifolia* Leaves. **Nat Prod Res**, v. 27, n. 18, p. 1646–1650, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23163304>>.

BANKOVA, V. et al. Phytochemical Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis from São Paulo State. **Z Naturforsch C**, v. 54, n. 5–6, p. 401–405, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10431391>>.

BÄSLER, K.; BRANDNER, J. M. **Tight junctions in skin inflammation***Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 2017. .

BATA-CSORGO, Z. et al. Kinetics and regulation of human keratinocyte stem cell growth in short-term primary ex vivo culture. Cooperative growth factors from psoriatic lesional T lymphocytes stimulate proliferation among psoriatic uninvolved, but not normal, stem keratinocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 1, p. 317–327, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1172/JCI117659>>.

BOLLER, S. et al. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, 2010.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6276474>>.

BUDEL, J. M. et al. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I - Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2005.

CAI, Y.; FLEMING, C.; YAN, J. New Insights of T Cells in the Pathogenesis of Psoriasis. **Cell Mol Immunol**, v. 9, n. 4, p. 302–309, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22705915>>.

CALOU, I. B. et al. Topically Applied Diterpenoids from *Egletes Viscosa* (Asteraceae) Attenuate the Dermal Inflammation in Mouse Ear Induced by Tetradecanoylphorbol 13-Acetate- and Oxazolone. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 8, p. 1511–1516, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18670081>>.

CASTINETTI, F.; BRUE, T.; CONTE-DEVOLX, B. The Use of the Glucocorticoid Receptor Antagonist Mifepristone in Cushing's Syndrome. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 19, n. 4, p. 295–299, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22543346>>.

CHANG, R. et al. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2008.

COATES, L. C. et al. **Psoriasis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis: Is all inflammation the same?** *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2016. .

COHEN, S. N.; BARON, S. E.; ARCHER, C. B. **Guidance on the diagnosis and clinical management of psoriasis** *Clinical and Experimental Dermatology*, 2012. .

CRUZ PADUA, B. et al. *Baccharis trimera* Improves the Antioxidant Defense System and Inhibits iNOS and NADPH Oxidase Expression in a Rat Model of

Inflammation. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2014.

DE YOUNG, L. M. et al. Edema and Cell Infiltration in the Phorbol Ester-Treated Mouse Ear Are Temporally Separate and Can Be Differentially Modulated by Pharmacologic Agents. **Agents Actions**, v. 26, n. 3–4, p. 335–341, 1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2567568>>.

DENG, Y.; CHANG, C.; LU, Q. **The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review** *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 2016. .

DO NASCIMENTO KAUT, N. N. et al. Baccharis trimera (Carqueja) improves metabolic and redox status in an experimental model of type 1 diabetes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2018.

DOS SANTOS, D. A. et al. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of Baccharis Dracunculifolia DC (Asteraceae) in Different Experimental Models. **J Ethnopharmacol**, v. 127, n. 2, p. 543–550, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19808087>>.

FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G. et al. Baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae) selectively modulates the effector functions of human neutrophils. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2017.

FREIRES, I. A. et al. Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7329–7358, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25911964>>.

GÁBOR, M. **Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

GARCIA-PEREZ, M.-E.; JEAN, J.; POULIOT, R. Antipsoriatic Drug Development: Challenges and New Emerging Therapies. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, 2012.

GASPARI, A. A. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2006.

GOFF, K. L. et al. The Global Burden of Psoriatic Skin Disease. **Br J Dermatol**, v. 172, n. 6, p. 1665–1668, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25645671>>.

GOLDSMITH, L. A. et al. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine Eighth Edition. **McGraw-Hill**, 2012.

GOLIER, J. A.; YEHUDA, R. Mifepristone as a Psychopharmacologic Agent:

Consideration of Efficacy, Plasma Levels, and Mechanism of Action. **Biol Psychiatry**, v. 84, n. 1, p. 5–6, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29929578>>.

GOMES, V.; FERNANDES, G. W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, 2002.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. **The skin microbiome** *Nature Reviews Microbiology*, 2011. .

HEINEMANN, C. et al. IL-27 and IL-12 oppose pro-inflammatory IL-23 in CD4+ T cells by inducing Blimp1. **Nature Communications**, 2014.

HUANG, T. H. et al. **Apoptotic or antiproliferative activity of natural products against keratinocytes for the treatment of psoriasis** *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. .

JIN, L.; WANG, G. Keratin 17: A Critical Player in the Pathogenesis of Psoriasis. **Medicinal Research Reviews**, 2014.

KABASHIMA, K. et al. **The immunological anatomy of the skin** *Nature Reviews Immunology*, 2019. .

KILKENNY, C. et al. Editorial: Animal research: Reporting in vivo experiments-The ARRIVE Guidelines. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 2011.

KLOPELL, F. C. et al. Nerolidol, an Antiulcer Constituent from the Essential Oil of *Baccharis Dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Z Naturforsch C**, v. 62, n. 7–8, p. 537–542, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17913068>>.

KOBAYASHI, T.; NAIK, S.; NAGAO, K. **Choreographing Immunity in the Skin Epithelial Barrier** *Immunity*, 2019. .

KOSTNER, L. et al. Allergic Contact Dermatitis. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 37, n. 1, p. 141–152, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27886903>>.

KRZYSZCZYK, P. et al. **The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes** *Frontiers in Physiology* *Frontiers Media S.A.*, , maio 2018. .

KULKARNI, N. M. et al. Topical Atorvastatin Ameliorates 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate Induced Skin Inflammation by Reducing Cutaneous Cytokine Levels and NF-KB Activation. **Arch Pharm Res**, v. 38, n. 6, p. 1238–1247, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25311664>>.

KUMAZAWA, S. et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis

by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 2003.

LAM, J.; POLIFKA, J. E.; DOHIL, M. A. Safety of Dermatologic Drugs Used in Pregnant Patients with Psoriasis and Other Inflammatory Skin Diseases. **J Am Acad Dermatol**, v. 59, n. 2, p. 295–315, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18410980>>.

LIVINGSTON, D. P.; HINCHA, D. K.; HEYER, A. G. **Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009. .

LOWES, M. A. et al. **The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses** *Trends in Immunology*, 2013. .

LOWES, M. A.; BOWCOCK, A. M.; KRUEGER, J. G. Pathogenesis and Therapy of Psoriasis. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 866–873, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314973>>.

MASSIGNANI, J. J. et al. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 10, p. 1355–1360, 1 out. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ptr.2624>>.

MENDES, D. A. G. B. et al. Hydroalcoholic extract of *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax displays potent anti-inflammatory activities through a glucocorticoid receptor-dependent pathway. **Phytomedicine**, 2016.

MISSIMA, F. et al. Effect of *Baccharis Dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) Extracts and Its Isolated Compounds on Macrophage Activation. **J Pharm Pharmacol**, v. 59, n. 3, p. 463–468, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17331351>>.

MURAKAWA, M. et al. Involvement of Tumor Necrosis Factor (TNF)-Alpha in Phorbol Ester 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate (TPA)-Induced Skin Edema in Mice. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 9, p. 1331–1336, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487490>>.

NAGATANI, Y.; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the Constituents from the Aerial Part of *Baccharis Dracunculifolia* DC. II. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 50, n. 5, p. 583–589, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036009>>.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs**

from 1981 to 2014 **Journal of Natural Products**, 2016. .

NIKAM, P. H. et al. Future trends in standardization of herbal drugs. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 2012.

ODOBASIC, D.; KITCHING, A. R.; HOLDSWORTH, S. R. **Neutrophil-mediated regulation of innate and adaptive immunity: The role of myeloperoxidase** **Journal of Immunology Research**, 2016. .

OH, J. et al. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. **Nature**, 2014.

ORTONNE, J. P. Aetiology and pathogenesis of psoriasis. In: *British Journal of Dermatology*, Supplement, **Anais...** 1996.

OTUKI, M. F. et al. Topical Antiinflammatory Effects of the Ether Extract from *Protium Kleinii* and Alpha-Amyrin Pentacyclic Triterpene. **Eur J Pharmacol**, v. 507, n. 1–3, p. 253–259, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15659316>>.

PANERO, J. L.; CROZIER, B. S. Macroevolutionary dynamics in the early diversification of Asteraceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 2016.

PAPIER, A.; STROWD, L. C. Atopic Dermatitis: A Review of Topical Nonsteroid Therapy. **Drugs Context**, v. 7, p. 212521, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29632548>>.

PARK, Y. K. et al. Chemical Constituents in *Baccharis Dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 5, p. 1100–1103, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14995105>>.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002.

PASPARAKIS, M.; HAASE, I.; NESTLE, F. O. **Mechanisms regulating skin immunity and inflammation** **Nature Reviews Immunology**, 2014. .

PAULINO, N. et al. Anti-Inflammatory Effects of a Bioavailable Compound, Artepillin C, in Brazilian Propolis. **Eur J Pharmacol**, v. 587, n. 1–3, p. 296–301, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474366>>.

RAMOS CAMPOS, F. et al. *Baccharis* (Asteraceae): Chemical Constituents and Biological Activities. **Chem Biodivers**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26765349>>.

RAO, T. S. et al. Comparative Evaluation of Arachidonic Acid (AA)- and Tetradecanoylphorbol Acetate (TPA)-Induced Dermal Inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723–741, 1993.

RICHMOND, J. M.; HARRIS, J. E. Immunology and skin in health and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2014.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. **Herbal drugs: Standards and regulation Fitoterapia**, 2010. .

SÁNCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of Leukocyte Influx in Tissue Prostaglandin H Synthase-2 Overexpression Induced by Phorbol Ester and Arachidonic Acid in Skin. **Biochem Pharmacol**, v. 58, n. 5, p. 877–879, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449199>>.

SCHULTZ, J.; KAMINKER, K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1962.

SENRA, L. et al. IL-17E (IL-25) Enhances Innate Immune Responses during Skin Inflammation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 8, p. 1732-1742.e17, 1 ago. 2019.

SFORCIN, J. M. et al. **Baccharis dracunculifolia: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira.** [s.l: s.n.]

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. **Mechanisms of the inflammatory response Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, 2004. .

SIEGFRIED, E. C.; JAWORSKI, J. C.; HEBERT, A. A. **Topical calcineurin inhibitors and lymphoma risk: Evidence update with implications for daily practice American Journal of Clinical Dermatology**, 2013. .

SIMÕES, L. M. et al. Effect of Brazilian Green Propolis on the Production of Reactive Oxygen Species by Stimulated Neutrophils. **J Ethnopharmacol**, v. 94, n. 1, p. 59–65, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15261964>>.

SONG, H. Y. et al. Topical Transduction of Superoxide Dismutase Mediated by HIV-1 Tat Protein Transduction Domain Ameliorates 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate (TPA)-Induced Inflammation in Mice. **Biochem Pharmacol**, v. 75, n. 6, p. 1348–1357, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18164693>>.

SOUZA, M. M. Q. et al. *Baccharis trimeria* (Less.) DC: An Innovative Cardioprotective Herbal Medicine Against Multiple Risk Factors for Cardiovascular Disease. **Journal of Medicinal Food**, p. jmf.2019.0165, nov. 2019.

STANLEY, P. L. et al. Mouse Skin Inflammation Induced by Multiple Topical Applications of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate. **Skin Pharmacol**, v. 4, n. 4, p. 262–271, 1991. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1789987>>.

STERN, R. S. et al. Psoriasis is common, carries a substantial burden even when not extensive, and is associated with widespread treatment dissatisfaction. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, 2004.

STROBER, B. et al. Depressive Symptoms, Depression, and the Effect of Biologic Therapy among Patients in Psoriasis Longitudinal Assessment and Registry (PSOLAR). **J Am Acad Dermatol**, v. 78, n. 1, p. 70–80, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29102053>>.

STUMHOFER, J. S. et al. A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling. **Nature Immunology**, 2010.

TERUI, T. Inflammatory and Immune Reactions Associated with Stratum Corneum and Neutrophils in Sterile Pustular Dermatoses. **Tohoku J Exp Med**, v. 190, n. 4, p. 239–248, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10877506>>.

TEUNISSEN, M. B. M. et al. Interleukin-17 and interferon- γ synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, 1998.

TROJAN-RODRIGUES, M. et al. Plants Used as Antidiabetics in Popular Medicine in Rio Grande Do Sul, Southern Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 139, n. 1, p. 155–163, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079795>>.

VALDIMARSSON, H. The Genetic Basis of Psoriasis. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 6, p. 563–567, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18021893>>.

VAN DER FITS, L. et al. In Psoriasis Lesional Skin the Type I Interferon Signaling Pathway Is Activated, whereas Interferon- α Sensitivity Is Unaltered. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 1, p. 51–60, 2004.

VAN LINTHOUT, S.; MITEVA, K.; TSCHÖPE, C. **Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells** *Cardiovascular Research* Oxford University Press, , maio 2014. .

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. **Gênero Baccharis (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos** *Química Nova* SciELO, , 2005. .

WAGNER, E. F. et al. **Psoriasis: What we have learned from mouse models***Nature Reviews Rheumatology*, 2010. .

WANG, R. et al. Glucocorticoids Enhance Muscle Proteolysis through a Myostatin-Dependent Pathway at the Early Stage. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0156225, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27227776>>.

WINK, M. Evolutionary Advantage and Molecular Modes of Action of Multi-Component Mixtures Used in Phytomedicine. **Current Drug Metabolism**, 2008.

WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, 2016.

WU, J. J. et al. **Epidemiology of mental health comorbidity in psoriasis***Journal of Dermatological Treatment*, 2018. .

XIAN, Y. F. et al. Comparison of the Anti-Inflammatory Effects of Sinapis Alba and Brassica Juncea in Mouse Models of Inflammation. **Phytomedicine**, v. 50, p. 196–204, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30466979>>.

ZALEWSKI, C. A. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of derivatives from aerial parts of *Baccharis uncinella*. **Pharmaceutical Biology**, 2011.

ZHANG, L. J. **Type1 interferons potential initiating factors linking skin wounds with psoriasis pathogenesis***Frontiers in Immunology*Frontiers Media S.A., , 2019. .

ZHANG, X.; YIN, M.; ZHANG, L.-J. Keratin 6, 16 and 17-Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. **Cells**, v. 8, n. 8, ago. 2019.