

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas

**Análise Experimental da ação Hepatoprotetora e
Antiinflamatória de *Baccharis trimera* (Less) DC Asteraceae**

Elisiane Lozza Paul

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Dissertação de Mestrado

2005

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P324a	<p>Paul, Elisiane Lozza</p> <p>Análise experimental da ação hepatoprotetora e antiinflamatória de <i>Baccharis trimera</i> (Less) DC Asteraceae / Elisiane Lozza Paul. – Porto Alegre, 2005.</p> <p>117 f.</p> <p>Contém dois artigos: “Avaliação do efeito hepatoprotetor do extrato aquoso de <i>Baccharis trimera</i> na intoxicação hepática por tioacetamida” e “Efeito antiinflamatório e imunomodulador do extrato aquoso de <i>Baccharis trimera</i> na pleurisia induzida em ratos e na linfoproliferação in vitro”.</p> <p>Diss. (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, UFRGS, 2005</p> <p>Orientação: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira</p> <p>1. <i>Baccharis Trimera</i>. 2. Plantas Medicinais. 3. Fitoterapia. I. Título. II. Avaliação do efeito hepatoprotetor do extrato aquoso de <i>Baccharis trimera</i> na intoxicação hepática por Tioacetamida. III. Efeito antiinflamatório e imunomodulador do extrato aquoso de <i>Baccharis trimera</i> na pleurisia induzida em ratos e na linfoproliferação in vitro.</p> <p>CDD: 615.321</p>
-------	--

Bibliotecária Responsável

Ginamara Lima Jacques Pinto
CRB 10/1204

**“Quem não compreende um olhar, tampouco compreenderá
uma longa explicação”**

Mário Quintana

Dedicatória

Ao Raul, por não ter deixado de acreditar

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, orientador desta pesquisa, pela confiança, compreensão, dedicação, paciência e profissionalismo durante a realização deste trabalho.

Ao Raul, pelo companheirismo, pela compreensão, pelo apoio, pelo incentivo, pela paciência... ou simplesmente pelo amor e carinho nestes últimos anos de minha vida.

Aos meus pais, Baldino E. Paul e Suzana W. Lozza Paul, pelos exemplos pessoal e profissional, mas acima de tudo pelo amor e confiança depositados em mim, desde o início de minha existência.

Ao meu pai e colega que, desde cedo, despertou em mim o gosto pelas análises clínicas.

A toda minha família, que sempre demonstrou interesse pelas minhas atividades profissionais, especialmente ao meu avô Darcy Lozza (in memoriam) e minha avó Nena Lozza, que me acolheram em sua casa no início de meus estudos na Universidade Federal de Santa Maria.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Ciências Médicas, UFRGS, pela oportunidade pessoal de aprimoramento científico e desenvolvimento intelectual dentro dos mais elevados padrões exigidos pelo curso.

Ao Eduardo Caberlon, mais do que colega e amigo, um irmão disposto a discutir interminavelmente sobre cultura de células, ou qualquer outro assunto, sempre pronto a ouvir e a auxiliar na minha formação pessoal e profissional.

Ao Telmo Castaman, grande amigo e “mago” da computação, pela ajuda, pela amizade, pela paciência e dedicação, desde os tempos da minha especialização na PUCRS.

Às amigas Karla B. Moreira e Carolina Bastos, pela dedicação e ensinamentos sobre a cultura de células e por terem sido, junto com o Edu, a Taísa e a Paula, meus braços na realização de alguns experimentos.

Ao Luis Dávila, pelo auxílio significativo na análise estatística desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisas em Biofísica da PUCRS, especialmente Aline Cunha, José Poloni (Bento), Vasyl Saciura, Adroaldo Lunardelli, Paola Tessele, Fernanda Nunes, Melissa S. Pires e muito em especial à minha “mana” Taísa M. Ferreira.

Ao Prof. Dr. Carlos Luiz Reischel, médico responsável pelo Serviço de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS e ao Dr. Alúcio Maciel, médico patologista do Serviço de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS, pela atenção e dedicação dispensadas durante a realização da análise histológica apresentada neste estudo.

À Dra. Mirna Barison, médica chefe do Serviço de Hemoterapia do Complexo Hospitalar Santa Casa e ao Dr. Dário Brum, supervisor médico do

Serviço de Hemoterapia do Complexo Hospitalar Santa Casa, pela compreensão e incentivo.

Aos colegas do Serviço de Hemoterapia do Complexo Hospitalar Santa Casa, especialmente às colegas bioquímicas Maria Luíza M. Assmann e Juliana V. Heredia, pelo apoio e compreensão.

Aos colegas Vanderlei Biolcchi, Roberto C. Viana Santos, Rafael Noal Moresco e Karla Barbosa Moreira, pela valiosa colaboração nesta pesquisa e pela amizade conquistada nestes anos.

Aos amigos que fiz no decorrer do curso, especialmente Aline L. Camargo, Valério Aquino, Mariana Saikofaller, Gustavo B. Fischer, entre outros.

Aos amigos Roberto e Sonia, Cyntia e Roberto, Ana Cristina, Denise Pereira, Andres e Griselda, Franco e Nina, pelo interesse no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Júlio Cavalheiro, my dear teacher, pela colaboração e amizade.

Aos doadores voluntários de sangue para os experimentos, principalmente ao Luiz Bortoncello.

A Centerlab, Central de Laboratórios Ltda, pelo empréstimo de material para realização de parte desta pesquisa.

A Faculdade de Biociências da PUCRS, por disponibilizar o seu biotério, os animais utilizados na pesquisa e a planta coletada na Casa de Vegetação.

Finalmente a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização desta dissertação.

Sumário

Lista de Abreviaturas	10
Lista de Figuras.....	11
Introdução.....	14
Revisão Da Literatura.....	15
Considerações sobre Plantas Medicinais.....	15
<i>Baccharis trimera</i>	16
Ação Hepatoprotetora.....	18
Ação Antiinflamatória.....	20
Objetivos.....	25
Referências da Revisão Da Literatura.....	26
Artigo Científico em Inglês.....	36
Abstract.....	36
Introduction.....	37
Material and Methods.....	38
Results.....	41
Discussion.....	42
References.....	45
Figures.....	48
Artigo Científico em Português.....	55
Resumo.....	55
Introdução.....	56

Materiais e Métodos.....	57
Resultados.....	61
Discussão.....	62
Referências.....	65
Figuras.....	68
Artigo Científico em Inglês.....	76
Abstract.....	76
Introduction.....	78
Material and Methods.....	80
Results.....	84
Discussion.....	86
References.....	89
Figures.....	91
Artigo Científico em Português.....	97
Resumo.....	97
Introdução.....	99
Materiais e Métodos.....	101
Resultados.....	106
Discussão.....	108
Referências.....	111
Figuras.....	113
Conclusões.....	119

Lista de Abreviaturas

B. trimera: *Baccharis trimera*

BTE: Extrato aquoso de *Baccharis trimera*

AST: Aspartato aminotransferase

ALT: Alanina aminotransferase

PMNs: Leucócitos polimorfonucleares

TAA: Tioacetamida

FHF: Falência Hepática Fulminante

COX 1: Cyclooxygenase 1

COX 2: Cyclooxygenase 2

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

IP: Intraperitoneal

IPL: Intrapleural

PBS: Phosphate Buffer Solution (Solução Salina Tamponada)

PHA: Fitohemaglutinina

SD: Standard Desviation

DP: Desvio Padrão

WT: Weight

OD: Optical Density

PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells

HE: Coloração Hematoxilina-Eosina

Lista de Figuras

Artigo 1

Figura 1. Níveis séricos de AST obtidos dos grupos experimentais tratados com TAA e do grupo controle. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais e o grupo TAA são indicadas por asterisco ($p < 0,05$). Diferenças significativas entre os grupos experimentais e o controle são expressas por # ($p < 0,05$)48 e 68

Figura 2. Níveis séricos de ALT obtidos dos grupos experimentais tratados com TAA e do grupo controle. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais e o grupo TAA são indicadas por asterisco ($p < 0,05$). Diferenças entre os grupos experimentais e o controle são expressas por # ($p < 0,05$)49 e 69

Figura 3. Microfotografia (HE 100X) de fígados provenientes do grupo controle. Parênquima hepático apresentando características histológicas normais.....50 e 70

Figura 4. Microfotografia (HE 100X) de fígados provenientes do grupo TAA. Evidente necrose centro-lobular e presença de infiltrado inflamatório.....51 e 71

Figura 5. Microfotografia (HE 100X) de fígados provenientes do grupo pré-tratado com BTE 200mg/kg de peso. Dano tecidual.....52 e 72

Figura 6. Microfotografia (HE 100X) de fígados provenientes do grupo pré-tratado com BTE 400mg/kg de peso. Dano tecidual.....53 e 73

Figura 7. Microfotografia (HE 100X) de fígados provenientes do grupo pré-tratado com BTE 800mg/kg de peso. Dano tecidual.54 e 74

Artigo 2

Figura 1. Efeitos de BTE no volume de exsudato obtido na pleurisia induzida por Carragenina em ratos. A diferença significativa entre os grupos pré-tratados e o grupo inflamação é indicada por asterisco ($p < 0,05$). A diferença significativa entre os grupos, comparados com o controle é indicada por # ($p < 0,05$).91 e 112

Figura 2. Efeitos de BTE na contagem total de células presentes no exsudato obtido na pleurisia induzida por Carragenina em ratos. A diferença significativa entre os grupos pré-tratados e o grupo inflamação é indicada por asterisco ($p < 0,05$). A diferença significativa entre os grupos, comparados com o controle é indicada por # ($p < 0,05$).92 e 113

Figura 3. Efeitos de BTE no percentual de PMNs presentes no exsudato obtido na pleurisia induzida por Carragenina em ratos. A diferença significativa entre os grupos pré-tratados e o grupo inflamação é indicada por asterisco ($p < 0,05$). A diferença significativa entre os grupos, comparados com o controle é indicada por # ($p < 0,05$).93 e 114

Figura 4. Efeitos de BTE na concentração proteica dosada no exsudato obtido na pleurisia induzida por Carragenina em ratos. A diferença significativa entre os grupos pré-tratados e o grupo inflamação é indicada por asterisco ($p < 0,05$). A

diferença significativa entre os grupos, comparados com o controle é indicada por # ($p < 0,05$).94 e 115

Figura 5. Efeitos do BTE sobre a proliferação de linfócitos estimulada por Fitohemaglutinina. A diferença significativa entre os grupos experimentais e o controle estimulado (PHA) é indicada por asterisco ($p < 0,05$). A diferença entre o grupo controle e o grupo PHA é indicada por # ($p < 0,05$).95 e 116

Figura 6. Efeitos do BTE sobre o percentual de células viáveis. A diferença significativa entre os grupos experimentais e o grupo controle é indicada por asterisco ($p < 0,05$).96 e 117

Introdução

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de erva medicinal na busca de alívio para alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável.

O interesse científico e econômico na obtenção de substâncias ativas a partir de princípios vegetais se deve a grande variedade e complexidade das moléculas sintetizadas pelas plantas, o que muitas vezes inviabiliza sua síntese em escala industrial.

Empresas do setor de fitoterápicos têm registrado aumento na comercialização de seus produtos, indicando a busca pela população de uma alternativa aos produtos sintéticos, que é justificada pela sistematização científica das drogas fitoterápicas.

O número reduzido de estudos sobre plantas medicinais pode ser explicado pela ausência de políticas de saúde que tratem sobre o tema, pela deficiência de metodologias adequadas de pesquisa e até pela falta de reconhecimento oficial da fitoterapia.

Analisando informações neste sentido, nosso grupo se mostrou interessado em desenvolver estudos para avaliar a ação hepatoprotetora e antiinflamatória do extrato aquoso de *Baccharis trimera*, uma planta nativa de nossa região e cujo efeito medicinal ainda é bastante empírico, apesar de sua larga utilização.

Revisão da Literatura

Considerações sobre Plantas Medicinais

O uso de plantas medicinais no auxílio do tratamento e prevenção de doenças é descrito desde tempos remotos.

O conhecimento passado de geração a geração, muitas vezes embasado em crenças e experiências indígenas, pode variar de país para país, considerando-se fatores culturais, históricos e atitudes pessoais, entretanto, é fato que seu uso tem longa história e que estas práticas fortemente estabelecidas ao longo dos anos têm demonstrado segurança e eficácia.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) [1], na China, 30 a 50% do consumo total de medicamentos se deve a remédios preparados a partir de plantas medicinais. Estima-se que na Europa, América do Norte e outras regiões industrializadas, mais de 50% da população utilizou, pelo menos uma vez, medicina popular ou alternativa.[1]

O conhecimento de que a natureza constitui uma grande fonte para o surgimento de novos medicamentos [2;3;4], auxiliando na descoberta de novas drogas de relevante significado clínico, demonstra a necessidade do desenvolvimento de projetos de educação, treinamento e pesquisas nesta área.

Apesar de evidências científicas da atividade e do uso de plantas medicinais, observa-se a necessidade da realização de estudos quanto à eficácia e segurança das mesmas, visto que o uso inadequado ou sem regulamentação pode acarretar efeitos negativos e até mesmo perigosos. As plantas medicinais que têm

avaliadas sua eficiência terapêutica, ação tóxica e segurança para uso, estão cientificamente aprovadas para serem utilizadas pela população nas suas necessidades básicas de saúde.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta a produção e o uso de produtos fitoterápicos, bem como os ensaios de eficácia e toxicidade.[5] As plantas com ação comprovada encontram-se registradas na Farmacopéia Brasileira.

A grande biodiversidade de nosso país e a importância de desenvolver estratégias para a conservação dos recursos vivos para um desenvolvimento sustentado, demonstram a importância dos estudos que relatam a existência de grande número de espécies utilizadas para fins medicinais [6;7]. A informação de que uma mesma espécie tem a mesma indicação de uso e dosagem em diferentes regiões demonstra grande probabilidade de que esta planta contenha um princípio ativo de interesse medicinal.

É notório, no Brasil e em outros países em desenvolvimento, que as plantas medicinais e fitoterápicos são muito utilizados e no entanto pouco destes produtos foram estudados de acordo com protocolos científicos modernos, ainda que seu uso tenha objetivos sociais relevantes.[8] A importância do uso e conhecimento sobre plantas medicinais está relacionada também com o isolamento físico de determinadas comunidades e dificuldade de acesso das mesmas, aos serviços de atendimento primário a saúde.[9]

Baccharis trimera

O gênero *Baccharis*, pertencente à família Asteraceae, é largamente utilizado na medicina popular para tratar problemas gastrointestinais, doenças do fígado, angina e processos inflamatórios [10;11]. Já foram demonstrados vários efeitos biológicos dos extratos, entre os quais destacam-se os efeitos citotóxicos contra células tumorais [12], ação antifúngica [13], atividade antimicrobiana [14], antiviral [15] e antioxidante [16]. Também foi relatado que algumas espécies apresentam ação tóxica para o gado ou para pequenos animais domésticos.[14;16]

O gênero *Baccharis* é bem conhecido pela presença de flavonas [17] e por produzir terpenóides, flavonóides e tricotecenos [18]. Os flavonóides têm sido observados como bons indicadores taxonômicos de tribos e subtribos da família Asteraceae.[19]

Baccharis trimera (Less) DC (Asteraceae), popularmente conhecida como carqueja, é uma planta sul-americana usada na medicina popular para tratar desordens gastrointestinais, reumatismo e ulcerações de pele.[20]

Estudos químicos revelaram a presença de flavonóides e terpenos em *B. trimera* [21], enquanto outros estudos identificam monoterpenóides, diterpenóides, flavonóides e esteróides [22]. A ocorrência natural nesta planta de compostos como terpenos, carquejol, derivados clerodane, saponinas e glicosídeos além de flavonóides, constitui interesse para análise e caracterização dos flavonóides, visto que os mesmos, devido a suas propriedades anti-hepatotóxicas, são aplicados em terapias hepáticas modernas [23].

Além das ações já atribuídas ao gênero *Baccharis*, pode-se destacar a ação analgésica e antiinflamatória demonstradas por Gené *et al.* [22], e relaxante da

musculatura lisa vascular [21]. Atividade bacteriostática e bactericida foi demonstrada por Avancini *et al.* [24] avaliando o decocto de *B. trimera*, enquanto testes em roedores parecem não revelar efeitos tóxicos da planta.[25]

Os flavonóides são um grupo diverso de fitoquímicos que são produzidos em altas quantidades pelas plantas, e que podem sofrer pequenas alterações em sua estrutura química, dando origem a vários derivados. Mais de 800 compostos com esqueleto básico dos flavonóides têm sido identificados.[26] Vários efeitos biológicos como antiinflamatório, antialérgico e anticarcinogênico [27], têm sido atribuídos aos flavonóides, e seu papel no estresse oxidativo é bem conhecido e relatado, bem como seus efeitos antiproliferativos e antioxidantes. [28]

Ação Hepatoprotetora

O fígado possui características peculiares e regula importantes processos metabólicos.[29;30] Devido a sua localização, é capaz de metabolizar em primeiro lugar as substâncias absorvidas pelo tubo digestivo tornando-se, em contrapartida, o primeiro órgão a se expor aos componentes tóxicos ingeridos.[31] Desempenha importante papel nas atividades bioquímicas do corpo humano, sendo de grande importância na manutenção do equilíbrio biológico dos vertebrados.

As doenças hepáticas são um sério problema de saúde, sendo a falência hepática fulminante (FHF) uma complicação da hepatite aguda e que apresenta alta mortalidade. [32;33] A FHF é caracterizada por necrose hepática maciça e encefalopatia, tendo o seu número de casos aumentado devido as hepatites virais e a doença hepática induzida por compostos químicos.

O risco de intoxicação hepática tem aumentado pela alta exposição a toxinas ambientais, pesticidas e uso frequente de quimioterápicos [34], enquanto que drogas convencionais ou sintéticas usadas no tratamento de doenças hepáticas podem ser algumas vezes inadequadas e causar sérios efeitos adversos.[35]

Muitas plantas usadas tradicionalmente no tratamento de distúrbios hepáticos têm merecido grande interesse, uma vez que podem ser utilizadas como potencial fonte de novos agentes terapêuticos capazes de serem aplicados no tratamento e prevenção do dano hepático.

Vários modelos experimentais são usados como forma de demonstrar a ação hepatoprotetora de determinadas plantas, entre os quais se destaca a indução da lesão hepática pela Tioacetamida [36;37;38], Tetracloreto de Carbono [39;40;41], Paracetamol [42;43] e Galactosamina [44;45].

Para se avaliar alterações hepáticas pode-se utilizar marcadores de lesão hepática, como Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Bilirrubinas e parâmetros histológicos [41;46], marcadores de colestase, como Fosfatase Alcalina e Gama Glutamil Transferase [36;37;38], ou marcadores de função hepática, como proteínas plasmáticas [36], amônia [36] e provas de coagulação.

A intoxicação hepática pela Tioacetamida (TAA) é um modelo experimental satisfatório capaz de causar dano hepático grave após administração aguda e cirrose após administração crônica, originando severas alterações na

permeabilidade celular, e inibindo a atividade mitocondrial, levando à morte celular [37].

Quando a membrana plasmática da célula hepática é danificada, uma variedade de enzimas normalmente localizadas no citosol é liberada na corrente circulatória [42] e a estimativa da concentração destas enzimas no soro torna-se um útil marcador quantitativo para avaliar o dano hepatocelular.[33;42;43;46]

Na avaliação histopatológica pode-se observar diferentes graus de dano hepático, com áreas em que há ruptura da microarquitetura celular, migração de leucócitos, infiltrado inflamatório e necrose centro-lobular.[47]

Mesmo com o grande avanço da medicina, existe um número reduzido de drogas que estimulam a função hepática, oferecendo proteção ao fígado contra danos ou auxiliando a regeneração celular.[48]

Formulações a partir de plantas medicinais empregadas na medicina popular para tratar problemas hepáticos têm sido pesquisadas quanto a sua ação hepatoprotetora, no entanto, o mecanismo da hepatoproteção ainda não está definido. Existem várias justificativas para explicar o efeito hepatoprotetor, onde se destacam a atividade antioxidante [48;49;43], a capacidade de inibição da peroxidação lipídica [50;51;43] e o estímulo à regeneração hepática, que é traduzido pelo aumento da síntese de proteínas ou aceleração dos processos de detoxicação e excreção.[42]

Tais propriedades interagem com as substâncias utilizadas nos modelos experimentais, reduzindo ou impedindo a produção de metabólitos tóxicos ou ainda protegendo a membrana plasmática do hepatócito de alterações.[52]

Ação Antiinflamatória

O sistema imunológico representa a principal barreira do hospedeiro contra agressões.[53] As respostas imunes são mediadas por leucócitos, que dão origem aos polimorfonucleares e aos macrófagos do sistema imune inato, e também aos linfócitos do sistema imune adaptativo.[54]

As células do sistema imune inato desempenham papel crucial na iniciação e posterior direcionamento da resposta imune adaptativa, apesar de não possuírem especificidade ou memória.[55] Já o sistema imune adaptativo apresenta especificidade na resposta, além de possuir memória imunológica, o que aumenta a resposta numa segunda exposição ao agente.

Apesar destas definições, na maioria das respostas imunológicas ocorre uma interação entre os dois sistemas, uma vez que o sistema imunológico é altamente regulado e integrado, possibilitando resposta local e sistêmica contra o agente.

Ao conjunto das manifestações hemodinâmicas, interações celulares e atividade de fatores solúveis em reação a algum tipo de agressão ao organismo, chama-se inflamação.

Os sinais e sintomas da inflamação são dor, rubor, calor e edema e refletem os efeitos das citocinas liberadas sobre os vasos sanguíneos locais.[53;54;55]. A vasodilatação e a permeabilidade aumentada dos vasos sanguíneos levam ao aumento do fluxo sanguíneo no local e ao extravasamento de fluidos, além da exsudação leucocitária.

Durante a inflamação, proteínas séricas e leucócitos são recrutados para as áreas de dano tecidual, sendo que este recrutamento depende da liberação de fatores vasoativos e quimiotáticos que aumentam a perfusão local de sangue, aumentando a permeabilidade microvascular e promovendo a migração de leucócitos da circulação para os tecidos.[56]

Na fase inicial da resposta inflamatória, os fenômenos vasoativos são predominantes e envolvem neutrófilos e macrófagos. Mais tarde, numa infecção, a resposta inflamatória também envolve os linfócitos, iniciando-se uma resposta imune adaptativa, ativada pelo antígeno em drenagem do local da infecção.

Avanços ocorridos nos últimos anos, para se compreender as bases celulares e moleculares da resposta imune, sugerem a possibilidade de se manipular esta resposta em favor de condições que propiciem maior saúde ao indivíduo.

As células envolvidas na resposta imune, inclusive linfócitos e monócitos, podem ser moduladas por vários tipos de agentes, como bactérias, plantas, fungos e produtos sintéticos.[57] Considera-se agente imunomodulador aquele que pode modular a resposta imune, sendo que seu efeito pode ser estimulante ou supressivo.[58]

Para atuarem na imunidade adaptativa, linfócitos específicos a antígenos raros devem proliferar abundantemente antes que possam se diferenciar em células efetoras funcionais, tendo grande importância a análise da proliferação induzida de linfócitos .

Os linfócitos quando ativados sofrem mitose e diferenciação, iniciando a liberação de citocinas; além disso expressam novos receptores que permitem o reconhecimento de citocinas liberadas por outras células.[53]

Os mitógenos policlonais são substâncias capazes de induzir mitose em linfócitos de diferentes especificidades ou origens clonais, parecendo desencadear essencialmente os mesmos mecanismos de crescimento, como antígenos.[54]

Atualmente, os ensaios de linfoproliferação utilizando mitógenos policlonais têm sido largamente utilizados para avaliar a ação imuno-regulatória de plantas [2;59;60] ou compostos sintéticos [61;62], no entanto cabe salientar que dados obtidos *in vitro* devem ser convertidos em informações e testes alternativos, uma vez que não são diretamente equivalentes aos testes *in vivo*, sendo considerados somente como uma fonte de informação.

A resposta inflamatória ocorre em fases distintas, mediadas por diferentes mecanismos, sendo a fase aguda caracterizada pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, a fase subaguda caracterizada pela infiltração de leucócitos e células fagocíticas, e a fase crônica proliferativa, por degeneração tecidual e fibrose [63].

A pleurisia induzida por Carragenina é um modelo útil para caracterização e triagem de novas drogas antiinflamatórias. Com este modelo pode-se avaliar simultaneamente a contagem total e diferencial de células, o volume de exsudato existente na cavidade, e a concentração de vários mediadores inflamatórios. A injeção de Carragenina no espaço pleural de ratos induz a uma resposta

inflamatória caracterizada pela afluência de células ao local e pelo aumento da permeabilidade vascular.[64]

A inflamação do pulmão é usualmente caracterizada por extensiva infiltração do tecido pulmonar por polimorfonucleares, o que é mais marcante no fluido bronquioalveolar, durante a fase aguda.[65]

Um grupo heterogêneo de compostos é utilizado para tratar os sinais e sintomas da inflamação. Os antiinflamatórios não esteróides são agentes comumente utilizados do tratamento de inflamações agudas e crônicas [65] por inibirem a atividade da enzima Cyclooxygenase 1 e 2 (COX1 e COX2) e consequente inibição da síntese de prostaglandinas. As prostaglandinas participam na patogênese da inflamação e da febre, e a capacidade de inibir sua síntese justifica a larga utilização destas drogas.

A existência de vários mediadores inflamatórios possibilita a existência de várias drogas com efeito antiinflamatório, que atuam em fases distintas da cascata inflamatória, com intensidades diferentes.

Alguns antiinflamatórios não esteróides não inibem a formação de eicasóides, como os leucotrienos, que também contribuem na inflamação e afetam a síntese de outros mediadores.[63]

Na pesquisa de novas drogas, a alteração de determinado perfil inflamatório pode indicar em que fase do processo inflamatório [66] a droga atua, sugerindo um possível mecanismo de ação [64], sem excluir outros efeitos adicionais e independentes da ação conhecida [67]. Também cabe salientar que muitas drogas

cujo mecanismo é conhecido são utilizadas como referência na pesquisa de novas substâncias antiinflamatórias.[49]

Objetivo Geral

Avaliar o potencial efeito hepatoprotetor e antiinflamatório do extrato aquoso de *Baccharis trimera*.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a ação hepatoprotetora do extrato aquoso de *B. trimera* em um modelo experimental de lesão hepática induzida pela Tioacetamida, em ratos Wistar.

2. Avaliar o efeito antiinflamatório do extrato aquoso de *B. trimera* em um modelo experimental de pleurisia induzida por Carragenina, em ratos Wistar.

3. Avaliar o efeito imunomodulador do extrato aquoso de *B. trimera* sobre células mononucleares de sangue periférico.

Referências Bibliográficas da Revisão da Literatura

1. World Health Organization. Tradicional Medicine. 2003 Maio; 134: [3 telas] Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134>
2. Geetha S, Sai RM, Singh V, *et al.* Anti-oxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) - and in vitro study. *J Ethnopharmacology* 2002; **79**: 373-378.
3. De Las Heras B, Slowing K, Benedi J, *et al.* Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *J Ethnopharmacology*. 1998; **61**:161-166.
4. Mongelli E, Pampuro S, Coussio J, *et al.* Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. *J Ethnopharmacology*. 2000;**71**:145-151.
5. Anvisa: Novas Regras padronizam produção de fitoterápicos – Notícias da Anvisa; Diário e Mensal 2004 mar; [9 telas disponíveis] Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2004>
6. Rodrigues VEG, Carvalho ADEC. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. *Ciênc. Agrotec.* v.25, Lavras 2001.
7. Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, *et al.* Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 2001; 1-23.
8. Simões CMO – Farmacognosia: da Planta ao medicamento. 5.ed. Rev.Ampl. Porto Alegre Ed. da Universidade/UFRGS, 2003

9. Vandebroek I, Calewaert JB, De Jonckheere S, *et al.* Use of medicinal plants and pharmaceuticals by indigenous communities in the Bolivian Andes and Amazon. *Bull World Health Organ.* 2004 **82**: 243-50.
10. Coelho MGP, Reis PA, Gava VB. *et al.* Anti-arthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. *Toxicology Letters.* 2004; **154**: 69-80.
11. Baggio CH, Freitas CS, Rieck L. *et al.* Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. *Pharmacological Research.* 2003; **47**: 93-98.
12. Monks NR, Ferraz A, Bordignon S, *et al.* In vitro cytotoxicity of extracts from Brazilian Asteraceae. *Pharmaceutical Biology* 2002; **40**: 494-500.
13. Ito CS, Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, *et al.* Atividade Fungitóxica do Extrato Bruto de *Baccharis trimera*. 2002 Mar [4 telas disponíveis] Disponível em: <http://Www.Cca.Uem.Br>
14. Feresin GE, Tapia A, Gimenez A, Ravedo AG, *et al.* Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacology.* 2003; **89**: 73-80.
15. Palomino SS, Abad MJ, Bedoya LM, *et al.* Screening of South American Plants against Human Immunodeficiency virus: Preliminary Fractionation of Aqueous Extract from *Baccharis trinervis*. *Biol. Pharm. Bull.* 2002; **25**: 1147-1150.
16. Mongelli E, Desmarchelier C, Rodrigues TJ, *et al.* In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. *J. Ethnopharmacology.* 1997; **58**: 157-163.

17. Sharp H, Bartholomew B, Bright C, Latif Z, *et al.* 6-Oxygenated flavones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae). *Biochemical systematics and Ecology* . 2001, **29**: 105-107.
18. Moreira FPM, Branco A, Pizzolatti MG, *et al.* Acid triterpenes and flavonoids from *Baccharis Ligustrina* (Asteraceae). *Biochemical systematics and Ecology*. 2003; **31**: 319-321.
19. Emerenciano VP, Militão JSLT, Campos CC, *et al.* Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical systematics and Ecology*. 2001; **29**: 947-957.
20. Carqueja, Tratado sobre Carqueja. 2004 Jul; [6 telas] Disponível em: <http://webs.uolsinetis.com.ar/fitomedicina/TratCarqueja.html>
21. Torres LMB, Gamberini MT, Roque NF, *et al.* Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*. 2000; **55**: 617-619.
22. Gené RM, Cartañá C, Adzet T, *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. *Planta Med*. 1996; **62**: 232-235.
23. Soicke H, Leng-Peschlow A, Characterisation of Flavonoids from *Baccharis trimera* and their Antihepatotoxic Properties. *Planta Medica* 1987: 37-39.
24. Avancini CAM, Wiest JM, Mundstock E. Atividade Bacteriostática e Bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (less.) DC, Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* vol. 52 nº3 Belo Horizonte, 2000.

25. Gamberini MT, Skorupa LA, Souccar C, *et al.* Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* Mart. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 86, 137-139.
26. Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*. 2002; **139**: 1-21.
27. Potapovich AI, Kostyuk VA. Comparative Study of Antioxidant Properties and Cytoprotective Activity of Flavonoids. *Biochemistry Moscow* : vol.68, n.5 2003.
28. Tapia A, Rodriguez J, Theoduloz C. *et al.* Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *J. Ethnopharmacology*. 2004; **2-3**: 155-161.
29. Bhandarkar MR, Khan A. Antihepatotoxic effect of *Nymphaea stellata* Willd., against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in albino rats. *J. Ethnopharmacology*. 2004; **91**: 61-64.
30. Achliya GS, Wadodkar SG, Dorle AK. Evaluation of hepatoprotective effect of Amalkadi Ghrita against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. *J. Ethnopharmacology*. 2004; **90**: 229-232.
31. Ross MH, Rowrell LJ. *Histologia - Texto e Atlas* - Ed. Médica Panamericana 1993.
32. Margeli AP, Papadimitriou L, Ninos S, *et al.* Hepatic stimulator substance administration ameliorates liver regeneration in an animal model of fulminant hepatic failure and encephalopathy. *Liver International*. 2003; **23**:171-178.

- 33.Bruck R, Aeed H, Shirin H, *et al.* The hidroxy radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *Journal of Hepatology*. 1999;**31**:27-38.
- 34.Orhan DD, Aslam M, Aktay G, *et al.* Evaluation of hepatoprotective effect of *Gentiana olivieri* herbs on subacute administration and isolation of active principle. *Life Science*. 2003; **72**: 2273-2283.
- 35.Rajesh MG, Latha MS. Preliminary evaluation of the antihepatotoxic activity of Kamilari, a polyherbal formulation. *J. Ethnopharmacology*. 2004; **91**: 99-104.
- 36.Galisteo M, Suárez A, Montilla MP, *et al.* Antihepatotoxic activity of *Rosmarinus tomentosus* in a model of acute hepatic damage induced by Thioacetamide. *Phytotherapy Research*. 2000; **14**:522-526.
- 37.Ahmad A, Pillai KK, Najmi AK, *et al.* Evaluation of hepatoprotective potencial of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. *J. Ethnopharmacology*. 2002; **79**: 35-41.
- 38.Shankar K, Vaidya VS, Wang T, Streptozotocin-induced diabetic mice are resistant to lethal effects of thioacetamide hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2003; **188**: 122-134.
- 39.Janakat S, Al-Merie H. Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. *J. Ethnopharmacology*. 2002; **83**:135-138.
- 40.Kim HS, Lim HK, Chung MW, *et al.* Antihepatotoxic activity of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on tetrachloride-intoxicated hepatocytes. *J. Ethnopharmacology*. 2000; **69**:79-83.

- 41.Hsiao G, Shen MY, Lin KH, *et al.* Antioxidative and Hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; **51**: 3302-3308.
- 42.Kumar G, Banu GS, Pappa PV, *et al.* Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacostrum* L. Against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. *J. Ethnopharmacology*. 2004; **92**:37-40.
- 43.Asha VV, Akhila S, Wills PJ, *et al.* Further studies on the antihepatotoxic activity of *Phyllanthus maderaspatensis* Linn. *J. Ethnopharmacology*. 2004; **92**: 67-70.
- 44.Nan JX, Park EJ, Nam JB, *et al.* Effect of *Acanthopanax koreanum* Nakai (Araliaceae) on d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced fulminant hepatitis. *J. Ethnopharmacology*. 2004; **92**:71-77.
- 45.Koizumi SI, Sonaka I, Fujitani S, *et al.* Mechanisms of the Protective Effect of L-Alanine to D-galactosamine-induced hepatocellular injury: comparative studies of L-alanine and pyruvates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002; **291**: 738-743.
- 46.Suja SR, Latha PG, Pushpangadan P, *et al.* Evaluation of hepatoprotective effects of *Helminthostachys zeylanica* (L.) Hoox against carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. *J. Ethnopharmacology*. 2004; **92**:61-66.
- 47.Speroni E, Cervellati R, Govoni P, Guizzardi S, *et al.* Efficacy of different *Cynara scolymus* preparations on liver complaints. *J. Ethnopharmacology*. 2003; **86**: 203-211.
- 48.Chattopadhyay RR, Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract: Part II. *J. Ethnopharmacology*. 2003; 217-219.

- 49.Özbek H, Çitoglu GS, Dülger H, *et al.* Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of *Ballota glandulosissima*. *J. Ethnopharmacology*. 2004; **95**: 143-149.
- 50.Valentão P, Carvalho M, Fernandes E, Carvalho F, *et al.* Protective activity of *Hypericum androsaemum* infusion against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in isolated rat hepatocytes. *J Ethnopharmacology*. 2004; **92**: 79-84.
- 51.Liu CF, Lin CH, Lin CC, *et al.* Antioxidative natural product protect against econazole-induced liver injuries. *Toxicology*. 2004; **196**: 87-93.
- 52.Kadarian C, Broussalis AM, Miño J, Lopez P. *et al.* Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (LAM) D.C. *Pharmacological Research*. 2002; **45**: 57- 61.
- 53.Scroferneker ML, Pohlmann PR, *Imunologia Básica e Aplicada*. Editora Sagra Luzzatto. 1ª edição.1998
54. Janeway CA, Travers P, Walport M *et al.* *Imunobiologia O Sistema Imunológico na Saúde e na Doença*. Artemed. 4º edição. 2000
- 55.McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, *et al.* The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Research Reviews*. 1997; **23**: 79-133.
- 56.Suffredini AF, Fantuzzi G, Badolato R, *et al.* New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol*. 1999; **19**: 203-214.
- 57.Souza-Fagundes EM, Gazzinelli G, Parreira GG, *et al.* In vitro activity of labdane diterpene from *Alomia myriadenia* (Asteraceae): immunosuppression via induction of apoptosis in monocytes. *International Immunopharmacology*. 2003; **3**: 383-392.

58. Dutta RC, Peptide immunomodulators versus infection; an analysis. *Immunology Letters*. 2002, **0**: 1-9.
59. Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *J. Ethnopharmacology*. 2000; **72**: 167-172.
60. Ram MS, Neetu D, Yogesh B, *et al.* Cyto-protective and immunomodulating properties of Amla (*Emblica officinalis*) on lymphocytes; an in-vitro study. *J. Ethnopharmacology*. 2002; **81**: 5-10.
61. Meky FA, Hardie LJ, Evans SW, *et al.* Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocytes proliferation and cytokine production. *Food and Chemical Toxicology*. 2001; **39**: 827-836.
62. Bauer ME, Papadopoulos A, Poon L, *et al.* Altered glucocorticoid immunomodulation in treatment resistant depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2002; **28**: 49-65.
63. Goodman & Gilman, The pharmacological basis of therapeutics. Nova York: ed. Library of Congress, 1996
64. Peters RR, Saleh TF, Lora M, *et al.* Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on Carrageenan-induced pleurisy in mice. *Life Science*. 1999; **64**: 2429-2437.
65. Cuzzocrea S, Mazzon E, Sautebin L, Protective effects of Celecoxib on lung injury and red blood cells modification induced by carrageenan in the rat. *Biochem Pharmacol*. 2001; **63**: 785-795.

- 66.Srinivasan K, Muruganandan S, Lal J, *et al.* Evaluation of anti-inflammatory activity of *Pongamia pinnata* leaves in rats. *J Ethnopharmacology*. 2001; **78**: 151-157.
- 67.Fröde TS, Souza GEP, Calixto JB. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*. 2002; **17**: 149-156.

Objetivo Específico

1. Avaliar a ação hepatoprotetora do extrato aquoso de *B. trimera* em um modelo experimental de lesão hepática induzida pela Tioacetamida, em ratos Wistar.

Evaluation of hepatoprotective effects of aqueous extract of *Baccharis trimera* in liver intoxication by Thioacetamide

Elisiane Lozza Paul, Vanderlei Biolcchi, Paola Tessele, Taísa M. Ferreira, Carlos Luiz Reischel, Jarbas Rodrigues de Oliveira

Abstract

Baccharis trimera (Less) DC (Asteraceae), known as “carqueja”, is popularly used in folk medicine to treat many disorders, including hepatobiliary problems.

An experimental model of liver intoxication induced by Thioacetamide was used to evaluate the effect hepatoprotective of *B. trimera* aqueous extract (BTE). The animals pre-treated with *B. trimera* aqueous extract at concentrations of 400 and 800mg/kg body weight(wt) showed a significant reduction in Aspartate Amino Transferase (AST) levels. The group pre-treated with 800mg/kg body weight of *B. trimera* extract showed a significant reduction of Alanine Amino Transferase (ALT) levels. The flavonoids, important constituents of plants, are able to reduce xenobiotic induced hepatotoxicity in animals. However, the reduction showed on AST and ALT levels was not possible to demonstrate in histological analysis.

Key Words: *Baccharis trimera*, Thioacetamide, hepatotoxicity, hepatoprotective effects.

Introduction

The liver regulates many important metabolic functions and liver diseases remain one of the serious health problems. However, there are not many drugs available for the treatment of liver disorders [1]. The nature offers a wide range of sources in order to protect or treat liver injuries, contrarily to conventional therapy [2].

Baccharis trimera Less DC (Asteraceae), found in South America and Brazil's subtropical region, is popularly known as "carqueja" and widely used in folk medicine internally, for the treatment of rheumatism, hepatobiliary disorders and diabetes and externally, in cases of skin ulceration and wounds. [3] The anti-inflammatory activity of *B. trimera* has been evaluated by paw edema tests.[4] Torres *et al.*[5] have reported the relaxant effects produced on the smooth musculature at rat portal vein preparations.

An experimental model of liver intoxication or fulminant hepatic failure has been described in rats, induced by the administration of Thioacetamide (TAA). Thioacetamide is a thiono-sulfur-containing compound able to cause liver injury after acute administration and cirrhosis after chronic administration [6].

The present study evaluates the hepatoprotective effects of aqueous extract of *B. trimera* (BTE) in an experimental liver intoxication model, using TAA.

Materials and Methods

Plant Material

Samples of *B. trimera* were obtained from Casa de Vegetação at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil, in summer. A voucher of specimen was deposited in the herbarium of PUCRS under number 9957 and authenticated by Dr Nelson Ivo Matzembacher, Department of Botany, PUCRS. Aerial parts of *B. trimera* (1g) were extracted in distilled water (5ml) at 80°C for 30 minutes to obtain the *Baccharis trimera* aqueous extract (BTE) at concentration 200mg/ml which was then filtered. From the BTE were obtained the concentrations used in experiments. The extract was prepared instead of procedure.

Animals

Wistar male rats (*Rattus norvegicus*) 200-300g were used in this experimental study. The animals were kept in environmentally controlled room temperature under light/dark cycle of 12 hours and were allowed free access to food and water. The tests were conducted in accordance with the National Institute of Health Policy Guidelines on Animal Care and the experimental protocol was approved by the Ethics Research Committee of PUCRS.

Chemicals

Thioacetamide P.A. (C₂H₅NS) was purchased from Vetec Química Fina Ltda.

Hepatotoxicity induced by Thioacetamide

The animals were randomly divided into eight groups. Hepatotoxicity was induced by oral administration of saline-dissolved TAA at dosage of 200mg/kg body wt [7] (TAA group), except in blank group which received saline solution. Three groups were pre-treated with BTE administered intraperitoneally at concentrations of 200, 400 and 800 mg/kg body wt 24hs before TAA intoxication (these groups were called TAA+200, TAA+400 and TAA+800 respectively). The blank group received saline solution administered intraperitoneally (IP) 24hs before TAA intoxication. There were other three groups pre-treated with BTE (200, 400 and 800mg/Kg body wt) which received saline in the same volume that the other groups received TAA. These groups were called *B. trimera* control.

After 24hs of TAA intoxication, or 24 hs after saline administration in the groups called *B. trimera* control and blank group, the rats were sacrificed by decapitation, when blood was collected. It was allowed to clot and then centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The serum samples were collected and left standing on ice until biochemical estimations. Livers were removed, washed with cold saline and preserved in neutral buffered formalin for histological evaluation.

Histology

The livers specimens were processed for light microscopy. This processing consists of fixing the samples in 10% neutral formalin solution, embedding them in paraffin, slicing and staining the sections with hematoxylin-eosin (HE). The liver tissues slices were independently scanned and scored, by two pathologists(CLR and ACAM), while the examiners were unaware of the group to which they belong. The extent of liver necrosis was estimated semiquantitatively, and lesions were scored as follows: (0) no necrosis; (1) necrosis moderate, limited in the centro-lobular area; (2) necrosis more severe defined as tissue damage in many areas of the parenchyma of liver.

Assessment of hepatic enzymes

The activities of serum aspartate amino transferase (AST) and alanine amino transferase (ALT) were measured by cynetic method, according to the manufacture's instructions. The enzyme activity was expressed as U/l.

Statistical Analysis

Results of biochemical estimations were expressed by means \pm SD and statistical differences between groups, were verified by one-way analysis of variance (ANOVA) using the SPSS software, version 11.5 complemented with Dunnett test ($p < 0,05$ was considered significant).

Results of histological examinations were estimated semiquantitatively and statistical differences between groups were verified by Kruskal Wallis test, using the SPSS software, version 11.5 ($p < 0.05$ was considered significant).

Results

In the groups which received just *B. trimera* the AST and ALT levels did not differ significantly from blank group. (data not showed).

In the group of rats given TAA (200mg/kg body wt) the biochemical parameters were significantly elevated when compared with blank groups.(Fig 1 and Fig 2).

Pre-treatment of rats with 400 and 800mg/Kg body wt of BTE exhibited a significant ($p < 0,05$) reduction in the TAA induced increase in the levels of AST (Fig1). Pre-treatment of rats with 800mg/Kg body wt of BTE exhibited a significant ($p < 0,05$) reduction in the TAA induced increase in the levels of ALT (Fig 2).

Specimens of the liver from blank group animals showed normal microarchiteture and the hepatic parenchyma was organized and hepatocytes seen in microscopic sections as cords of cells (Fig 3). In samples from liver of TAA-treated rats some areas showed contiguous cells rupture, necrotic tissue and is evident a migration of leukocytes (Fig 4).

The groups pre-treated with *B. trimera*, the histological analysis did not differ significantly from TAA group.($p < 0.777$) (Fig 5, Fig 6 and Fig 7).

Discussion

Previous phytochemicals investigations of *B. trimera* described the known naturally occurring components of this plant like terpenes, carquejol, clerodane derivatives, saponins and glycosids [8,9], substance classes usually not having hepatoprotective properties. Flavonoids might dramatically affect the plasma concentrations of pharmaceutical drugs resulting in either overdose or loss of their therapeutic effect. These changes are an expected consequence of cytochrome P450 induction and/or modulation of cytochrome activity by flavonoids.[10] Flavonoids like quercetin, luteolin, nepetin, apigenin and hispidulin have been shown to be important constituents of *B. trimera* [11]. It is known that some flavonoids are able to reduce xenobiotic-induced hepatotoxicity in animals. These compounds also exert antioxidant effects that can provide a basis for their pharmacological properties [12]. Several classical antioxidants have been shown to protect hepatocytes against lipid peroxidation or inflammation, thereby preventing the occurrence of hepatic necrosis [13].

The hepatotoxicity induced by TAA in rats was previously characterized by clinical, biochemical and histopathologic methods and proved to be a reliable and satisfactory model of liver damage [7,14,15,16,17]. The TAA is a thiono-sulfur-containing compound endowed with liver damaging and carcinogenic activity [14]. Toxicity experienced by the liver during TAA poisoning results from the production of a metabolite, thioacetamide-s-oxide which is a direct hepatotoxin, responsible for change in cell permeability and that inhibits mitochondrial activity followed by cell

death [16]. Damage to the structural integrity of liver is reflected by increase in the liver hepato-specific enzymes (ALT and AST) in serum because they are cytoplasmatic in location and are released into circulation after cellular damage[18]. ALT is exclusively cytoplasmatic and AST are found in both, mitochondrial and cytoplasmatic forms. Liver disease is the most important cause of increased ALT activity and a common cause of increased AST activity. The half life of total AST in the circulation is 17 ± 5 h, whereas that of ALT is 47 ± 10 h. The half-life of mitochondrial AST averages 87h [19].

In the pre-treatment with of 800mg/kg body wt of BTE we observed the significant reduction in ALT levels. The pre-treatment with 400 and 800mg/kg body wt of BTE showed the reduction on TAA induced elevation of serum AST activity. The significant reduction caused by pre-treatment with *B. trimera* seems to possess a dose-dependent effect. In rats of blank groups or that received just BTE (200, 400 and 800 mg/kg body wt) the histologic architecture was normal. However, when TAA was administered, even with *B. trimera*, the damage tissue is evident and was impossible to define which dosage of *B. trimera* had more protective effect. This data suggests the possibility that *B. trimera* extract is able to reduce the biochemical parameters but this reduction showed a moderate effect, without significative differences, on histological examination of the liver samples. It may be explained because of the dosage to intoxication was much high, the necrosis caused by TAA was very potent and difficult to reduce, or yet because the form of administration of the hepatotoxicant or *B. trimera* is not the most indicated. We need to consider that administration of the extract itself may possess other

properties yet unknown and not possible to show in histological analysis, however AST and ALT are the most sensitive tests for diagnosis of liver diseases [20].

In conclusion, we demonstrated the hepatoprotective effect of *B. trimera* aqueous extract, with significant reduction in hepatic enzymes levels. However more studies will be necessary to evaluation and elucidation of hepatoprotective properties of *B. trimera*, in order to determine concentrations, kinds of extracts and forms of administration.

References

1. Bhandakar MR, Khan A. Antihepatotoxic effect of *Nymphaea stellata* Willd., against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 91: 61-64.
2. Orhan DD, Aslan M, Aktay G, Ergun E, Yesilada E, Ergun F. Evaluation of hepatoprotective effect of *Gentiana olivieri* herbs on subacute administration and isolation of active principle. *Life Sciences* 2003; 72: 2273-2283.
3. Simões CMO, Mentz LA, Schenkel EP, Irgang BE, Stehmann JR. *Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul*. Ed. UFRGS: Porto Alegre, 1986: 42-43.
4. Gené RM, Cartaña C, Adzet T, Marín E, Parella T, Cañigüeral S. Anti-inflammatory and Analgesic Activity of *Baccharis trimera*: Identification of its Active Constituents. *Planta Medica* 1996; 62: 232-235.
5. Torres LMB, Gamberini MT, Roque NF, Lima-Landman MT, Souccar C, Lapa AJ. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry* 2000; 55: 617-619.
6. Margeli AP, Papadimitriou L, Ninos S, Manolis E, Mykoniatis MG, Theocharis SE. Hepatic stimulator substance administration ameliorates liver regeneration in an animal model of fulminant hepatic failure and encephalopathy. *Liver International* 2003; 23: 171-178.
7. Galisteo M, Suárez A, Montilla MP, Utrilla MP, Jiménez J, Gil A, Faus MJ, Navarro MC. Antihepatotoxic activity of *Rosmarinus tomentosus* in a Model of

- Acute Hepatic Damage Induced by Thioacetamide. *Phytotherapy Research* 2000; 14: 522-526.
8. Bohlmann F, Zdero C. *Tetrahedron Lett* 1961; 28: 2419-2421.
 9. Ferretti-Alloise MG, Jacot-Guillarmond A, Naves YR. *Helv Chim Acta* 1970; 53: 201-208.
 10. Hodek P, Trafil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions* 2002; 139: 01-21.
 11. Soicke H, Leng-Peschlow E. Characterisation of Flavonoids from *Baccharis trimera* and their Antipatotoxic Properties. *Planta medica* 1987; 37-39.
 12. Kadarian C, Broussalis AM, Miño J, Lopez P, Gorzalczany S, Ferraro G, Acevedo C. Hepatoprotective Activity of *Achyrocline Satureioides* (LAM) DC. *Pharmacol Res* 2002; 45: 58-61.
 13. Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chou DS, Lin C, Su CH, Sheu JR. Antioxidative and Hepatoprotective Effects of *Antrodia camphorata* Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 3302-3308.
 14. Bruck R, Aeed H, Shirin H, Matas Z, Zaidel L, Avni Y, Halpern Z. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *Journal of Hepatology* 1999; 31: 27-38.
 15. Shankar K, Vaidya VS, Wang T, Bucci TJ, Mehendale HM. Streptozotocin-induced diabetic mice are resistant to lethal effects of thioacetamide hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2003; 188: 122-134.

16. Kumar G, Banu GS, Pappa PV, Sundararajan M, Pandian MR. Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 92: 37-40.
17. Ahmad A, Pillai KK, Najmi AK, Ahmad SJ, Pal SN, Balani DK. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 79: 35-41.
18. Janakat S, Al-Merie H. Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 83: 135-138.
19. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury.I. Performance Characteristics of Laboratory Tests. *Clinical Chemistry* 2000; 12: 2027-2049.
20. Suja SR, Latha PG, Pushpangadan P, Rajasekharan S. Evaluation of hepatoprotective effects of *Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook against carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 92: 61-66.

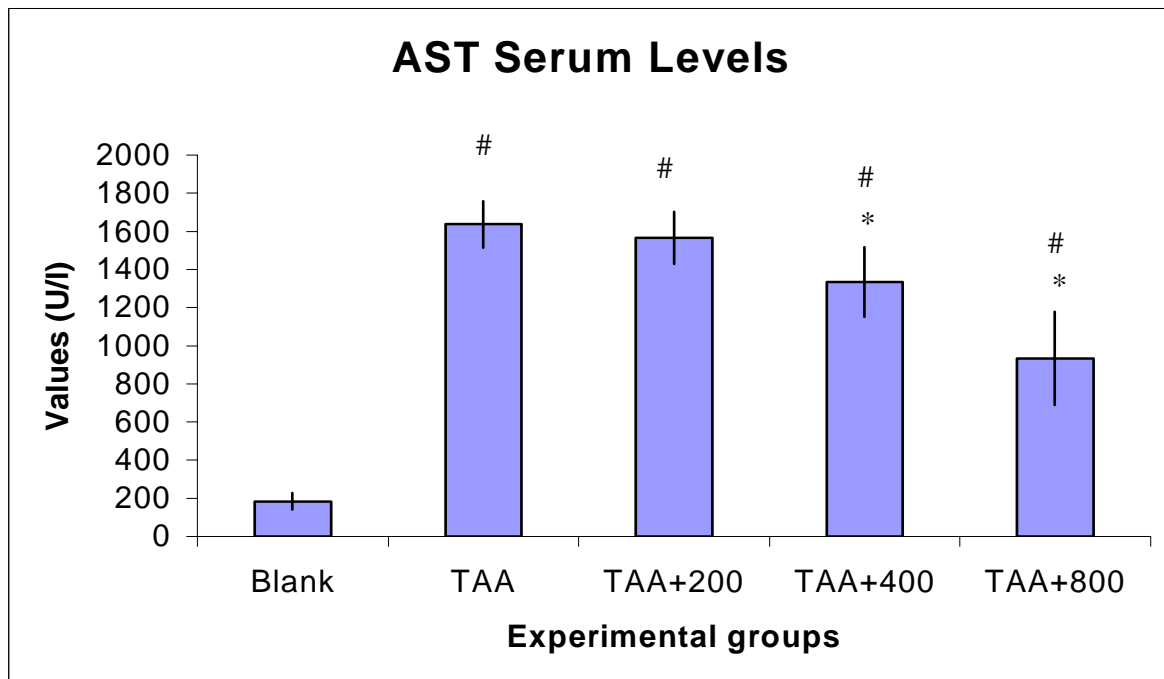


FIG 1- Serum levels of AST. Treatment details are as under Material and Methods. Results are expressed as means \pm SD (n= 10, except in TAA+200 n=9 and TAA n=6). The asterisk indicates AST levels are significantly lower than in the group which received just TAA, without *B. trimera*. The symbol # indicates AST levels are significantly higher than in the blank group ($p < 0,05$).

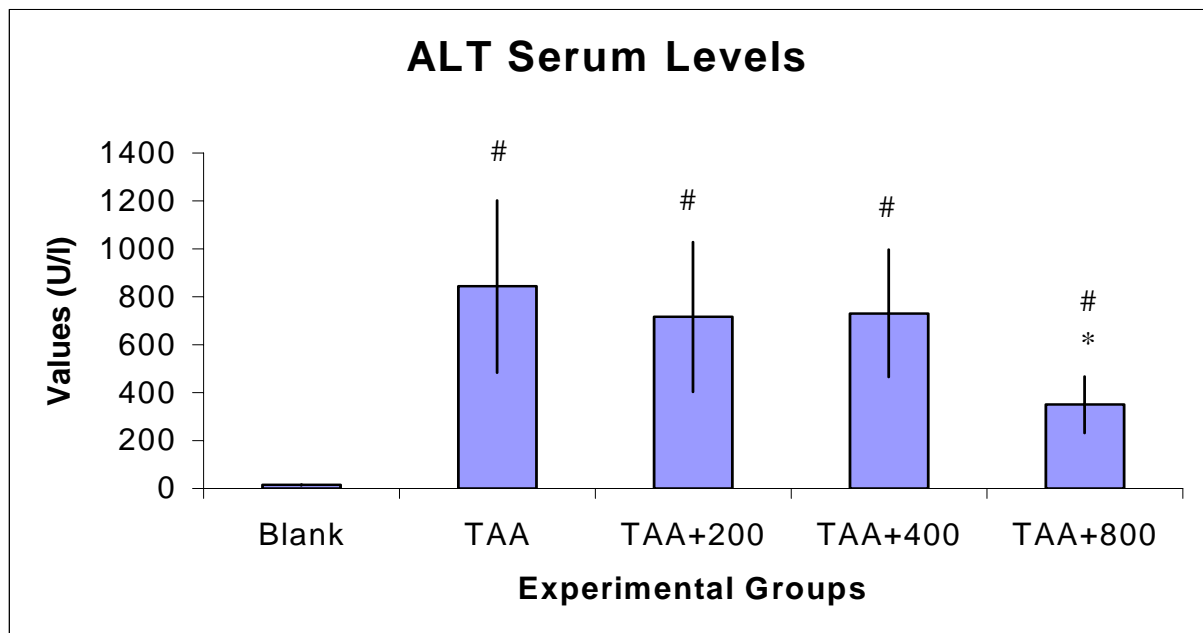


FIG 2- Serum levels of ALT. Treatment details are as under Material and Methods. Results are expressed as means \pm SD (n= 10, except in TAA+200 n=7 and TAA n=6). The asterisk indicates ALT levels are significantly lower than in the group which received just TAA, without *B. trimera*. The symbol # indicates ALT levels are significantly higher than in the blank group ($p < 0,05$).

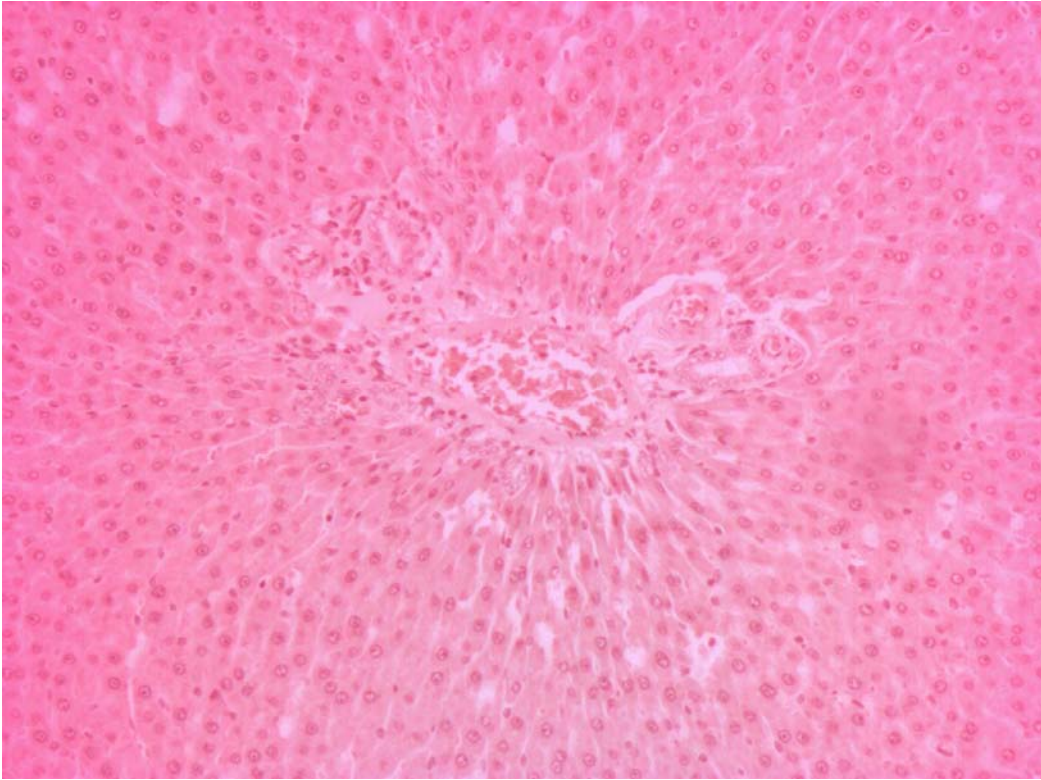


Fig.3 Liver specimens from blank group showed normal microarchitecture of the hepatic parenchyma (100X).

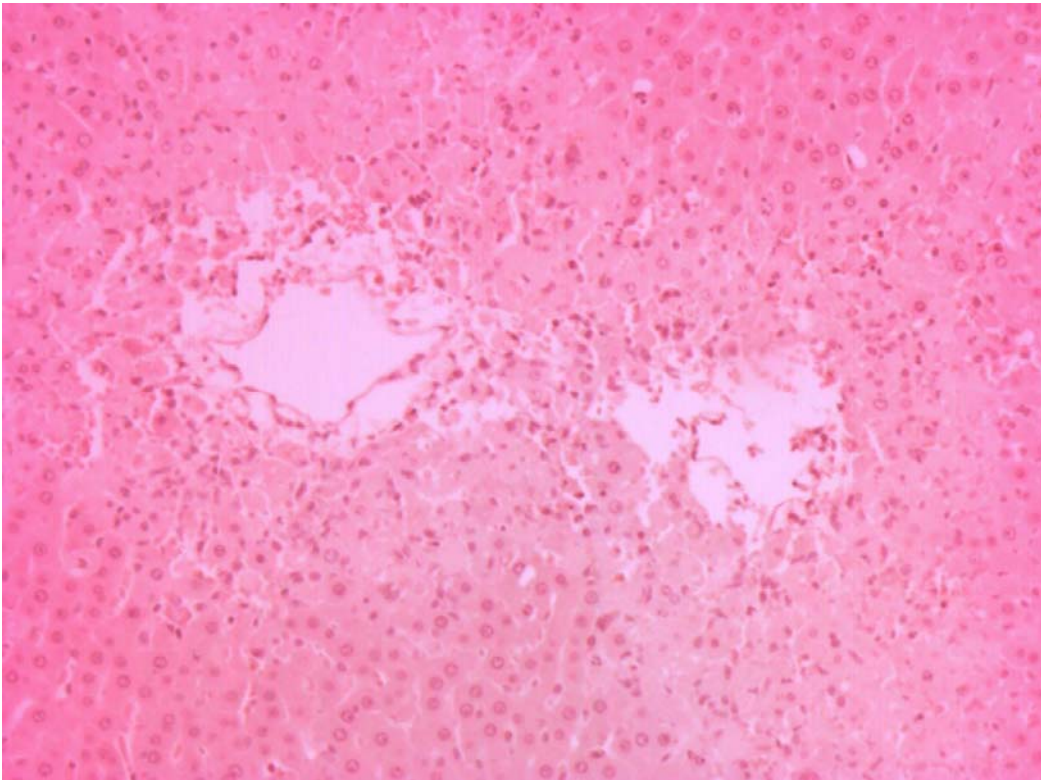


Fig.4 Liver specimens from TAA group animals, showed some areas with necrotic tissue, migration of leukocytes and contiguous cell rupture. (100X).

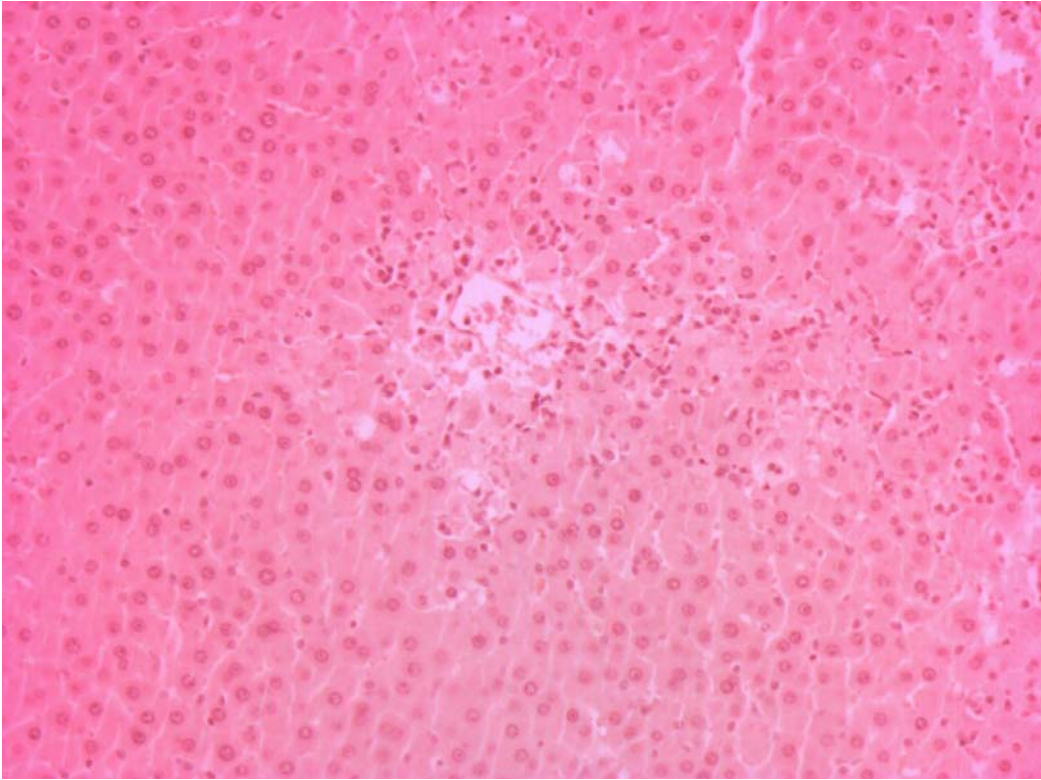


Fig. 5 Liver specimens from TAA + 200 mg/Kg showed tissue damage. Histological analysis did not difere from TAA group.(100X)

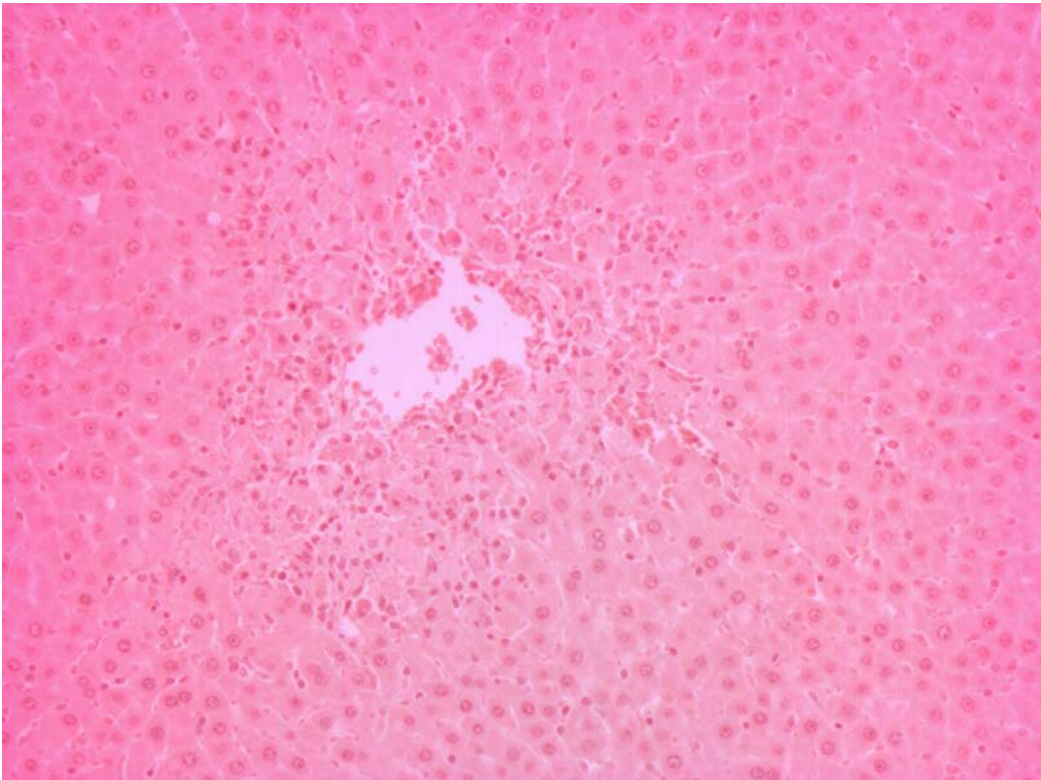


Fig. 6 Liver specimens from TAA + 400 mg/Kg showed tissue damage. Histological analysis did not difere from TAA group.(100X)

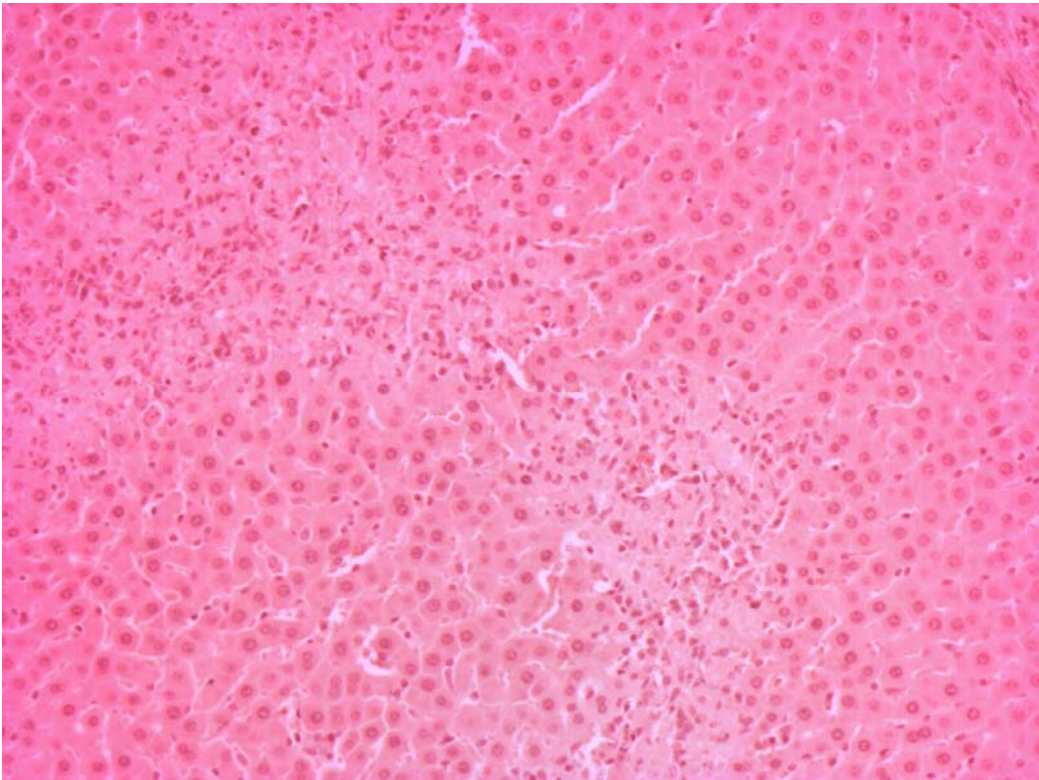


Fig. 7 Liver specimens from TAA + 800 mg/Kg showed tissue damage. Histological analysis did not difere from TAA group.(100X)

**Avaliação do efeito hepatoprotetor do extrato aquoso de *Baccharis trimera* na
intoxicação hepática por Tioacetamida**

Elisiane Lozza Paul, Vanderlei Biolcchi, Paola Tessele, Taísa M. Ferreira, Carlos
Luiz Reischel, Jarbas Rodrigues de Oliveira.

Resumo:

Baccharis trimera (Less) DC (*Asteraceae*), conhecida como carqueja, é popularmente usada na medicina caseira para tratar várias doenças, incluindo problemas hepatobiliares.

Um modelo experimental de intoxicação hepática induzida pela Tioacetamida foi usado para avaliar o efeito hepatoprotetor do extrato aquoso de *B. trimera* (BTE). Os animais pré-tratados com BTE nas concentrações de 400 e 800 mg/kg de peso mostraram uma significativa redução nos níveis de Aspartato Amino Transferase (AST). O grupo pré-tratado com 800mg/kg de peso de BTE mostrou uma significativa redução nos níveis séricos de Alanina Amino Transferase (ALT). Os flavonóides, importantes constituintes das plantas, têm a capacidade de reduzir a hepatotoxicidade induzida por xenobióticos em animais. A redução demonstrada nos níveis séricos das enzimas hepáticas não pode ser demonstrada na análise histopatológica.

Palavras Chave: *Baccharis trimera*, Tioacetamida, hepatotoxicidade, efeito hepatoprotetor.

Introdução

O fígado regula várias funções metabólicas importantes e as doenças hepáticas constituem um sério problema de saúde, entretanto, não existem muitas drogas disponíveis para o tratamento de desordens hepáticas.[1] A natureza constitui-se como uma grande fonte de produtos capazes de proteger ou tratar doenças hepáticas, contrariamente a terapia convencional.[2]

Baccharis trimera é uma planta pertencente à família *Asteraceae*, encontrada na América do Sul e região subtropical do Brasil, conhecida popularmente como carqueja e largamente usada na medicina caseira, internamente para tratar reumatismo, problemas hepatobiliares e diabetes melito e, externamente em casos de ulcerações de pele e torções.[3] A atividade antiinflamatória de *B. trimera* tem sido avaliada em testes de edema de pata [4], enquanto Torres *et al.* demonstraram efeito relaxante produzido na musculatura lisa em preparações da veia portal de ratos [5].

Um modelo experimental de intoxicação hepática ou falência hepática fulminante tem sido descrito em ratos, induzido pela administração de Tioacetamida (TAA). A TAA é um composto contendo enxofre e capaz de causar dano hepático após administração aguda ou cirrose após administração crônica [6].

O presente estudo avalia os efeitos hepatoprotetores do extrato aquoso de *B. trimera* num modelo experimental de intoxicação hepática, usando a TAA.

Materiais e Métodos

Matéria vegetal

Amostras de *B. trimera* foram coletadas no verão, na Casa de Vegetação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Uma amostra da espécie foi depositada no Herbário da PUCRS, sob número 9957 e autenticada pelo Dr. Nelson Ivo Matzembacher, do Departamento de Botânica, PUCRS. Partes aéreas da planta (1g) foram extraídas em água destilada (5ml) a 80°C durante 30 minutos e após o extrato foi filtrado, obtendo-se o extrato aquoso de *B. trimera* (BTE). A partir do BTE, cuja concentração é de 200mg/ml, foram obtidas as concentrações usadas nos experimentos. O extrato foi preparado pouco antes de ser usado nos experimentos.

Animais

Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) pesando entre 200-300 g foram utilizados no estudo experimental. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada, sob ciclo de 12 horas de luz/escuro e com acesso livre a alimento e água. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as políticas e normas vigentes para experimentação animal e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.

Reagentes

Tiaocetamida P.A. (C₂H₅NS) foi obtida de Vetec Química Fina Ltda. Brasil

Hepatotoxicidade induzida por Tioacetamida

Os animais foram randomicamente divididos em 8 grupos. A hepatotoxicidade foi induzida pela administração oral de TAA dissolvida em solução salina na dose de 200mg/kg de peso [7] (Grupo TAA), exceto no grupo controle, que recebeu o mesmo volume de solução salina. Três grupos foram pré-tratados com extrato aquoso de *Baccharis trimera* (BTE) nas concentrações de 200, 400 e 800 mg/kg de peso (TAA+200, TAA+400 e TAA+800), administrado intraperitoneal (IP) 24 hs antes da intoxicação por TAA. O grupo TAA recebeu solução salina administrada IP 24 hs antes da intoxicação por TAA. O grupo controle recebeu solução salina 24 hs antes da intoxicação. Em três grupos pré-tratados com BTE (200, 400 e 800mg/kg de peso) a indução da lesão hepática não ocorreu, tendo sido administrado solução salina via oral, no mesmo volume que os outros grupos receberam TAA. Estes grupos foram chamados de grupos controle de BTE.

Após 24 horas da intoxicação pela TAA, os ratos foram decapitados e foi coletado sangue, separadas amostras de soro que foram congeladas para realização de análises bioquímicas. Os ratos do grupo controle foram decapitados 24hs após a administração de solução salina, tendo sido coletado sangue e separadas amostras de soro para realização de testes como nos demais grupos. Os fígados dos animais foram removidos, lavados em solução salina e preservados em formalina tamponada para análise histopatológica.

Histologia

As amostras de fígado foram processadas por microscopia óptica. As amostras foram fixadas em solução de formalina neutra 10%, depois colocadas em blocos de parafina, cortadas e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). As amostras de fígado foram analisadas por dois patologistas independentes (CLR e ACAM) que desconheciam o grupo ao qual as amostras pertenciam. A extensão da lesão hepática (necrose) foi avaliada semiquantitativamente através de um escore criado para este fim e descrito a seguir: escore (0) quando não existe necrose; escore (1) necrose moderada restrita à região centro-lobular; escore (2) necrose mais severa com dano em áreas mais extensas do parênquima hepático.

Medida da lesão hepática

A atividade no soro da Aspartato Amino Transferase (AST) e Alanino Amino Transferase (ALT) foi medida por método cinético, de acordo com as instruções do fabricante. A atividade enzimática foi expressa em U/l.

Análise Estatística

Os resultados das medidas dos parâmetros bioquímicos foram expressos em média \pm desvio padrão e as diferenças estatísticas entre os grupos foram verificadas por Análise de Variância “one-way” (ANOVA) utilizando-se o software

SPSS versão 11.5 complementada pelo teste de Dunnet. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Os resultados da análise histológica foram expressos semiquantitativamente e a diferença entre os grupos foi verificada pelo teste de Kruskal Wallis utilizando-se o software SPSS versão 11.5. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

Nos grupos que receberam apenas *B. trimera* os níveis de ALT e AST não apresentaram diferença significativa do grupo controle. (Dados não mostrados)

No grupo de ratos que recebeu TAA os parâmetros bioquímicos foram significativamente elevados quando comparados com o grupo controle (Fig 1 e Fig 2). Os ratos pré-tratados com BTE nas concentrações de 400 e 800mg/kg exibiram uma redução significativa nos níveis de AST ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo TAA.(Fig1). O pré-tratamento com BTE na concentração de 800mg/kg, mostrou uma significativa redução ($p < 0,05$) nos níveis de ALT, quando comparados com o grupo TAA .(Fig2).

Amostras obtidas do grupo controle mostraram fígados com microarquitetura normal, parênquima organizado e hepatócitos dispostos tais como um cordão de células (Fig 3). Nas amostras de fígado provenientes de ratos que receberam TAA, algumas áreas apresentavam ruptura da contiguidade das células, necrose tecidual e evidente migração de leucócitos.(Fig 4). Nos ratos pré-tratados com BTE a análise histológica não apresentou diferença significativa, quando comparada com o grupo de animais que recebeu TAA.($p < 0.777$) (Fig 5, Fig 6 e Fig7).

Discussão

Investigações fitoquímicas prévias realizadas em *B. trimera* descreveram a ocorrência de componentes nesta planta como: terpenos, carquejol, derivados clerodane, saponinas e glicosídeos [8;9], substâncias as quais não são usualmente reconhecidas como possuidoras de atividade hepatoprotetora.

Flavonóides podem afetar dramaticamente a concentração plasmática de certas drogas farmacêuticas, resultando em overdose ou diminuição de seus efeitos terapêuticos. Estas mudanças são uma consequência esperada da indução e ou modulação da atividade do Cytocromo P450 pelos flavonóides [10].

Flavonóides como quercetina, luteolina, nepetina, apigenina e hispidulina têm demonstrado ser importantes constituintes de *B. trimera* [11]. Já é reconhecido que alguns flavonóides são capazes de reduzir a hepatotoxicidade induzida por xenobióticos em animais. Esses compostos também exercem efeito antioxidante, o que pode ser a base de suas propriedades farmacêuticas [12]. Muitos antioxidantes clássicos têm demonstrado proteger os hepatócitos contra a peroxidação lipídica ou inflamação, prevenindo deste modo a ocorrência de necrose hepática [13].

A hepatotoxicidade induzida pela TAA em ratos foi caracterizada previamente por métodos clínicos, bioquímicos e histopatológicos, sendo considerada um modelo satisfatório e realizável de dano hepático [7;14;15;16;17]. A TAA é um composto contendo thiono-enxofre com atividade carcinogênica e hepatotóxica [14]. A toxicidade apresentada durante a intoxicação pela TAA resulta

da produção de um metabólito, o Tioacetamida-s-óxido, que é diretamente hepatotóxico e responsável por mudanças na permeabilidade celular e inibição da atividade mitocondrial, seguida de morte celular [16]. O dano na integridade estrutural do fígado é traduzido pelo aumento de enzimas hepáticas (AST e ALT) no soro, já que as mesmas têm localização citoplasmática e são liberadas na circulação, após o dano celular [18]. ALT é exclusivamente citoplasmática e AST é encontrada na forma mitocondrial e citoplasmática. A doença hepática é a causa mais importante de aumento da atividade da ALT e a causa mais comum de aumento da atividade da AST. A meia-vida da AST total na circulação é de 17 ± 5 h, enquanto que da ALT é de 47 ± 10 h. A meia-vida da AST mitocondrial é, em média, 87 h. [19]

O pré-tratamento com BTE na concentração de 800mg/kg de peso mostrou reduzir a elevação da atividade de ALT causada pela administração de TAA. Na concentração de 400mg/kg de peso, observamos redução significativa nos níveis de AST e ALT. A significativa redução causada pelo pré-tratamento com BTE parece possuir um efeito dose dependente. Por outro lado, esta redução nos parâmetros bioquímicos mostrou um efeito moderado, porém sem significância estatística, na análise histológica das amostras de fígado. Os ratos do grupo controle, ou aqueles que receberam somente *B. trimera* (200, 400 e 800mg/kg) apresentaram arquitetura histológica normal. Entretanto quando TAA foi administrada, mesmo nos grupos pré-tratados com BTE, o dano tecidual é evidente sendo impossível definir, pela histologia, qual a dose de BTE que apresentou maior efeito hepatoprotetor. A administração de BTE atenuou o aumento dos níveis das

enzimas hepáticas, induzido pela TAA. Estes dados sugerem a possibilidade do BTE ser capaz de reduzir os parâmetros bioquímicos, mas esta redução não é acompanhada pela análise histopatológica. Este fato pode ser explicado pela dose usada para induzir a lesão hepática ser muito alta, ou a necrose causada pela TAA muito potente, provocando alterações nos níveis das enzimas hepáticas, que não são detectadas na análise histológica, ou ainda porque a via de administração do hepatotóxico ou do extrato não é a mais indicada. É importante considerar também que a administração do extrato, por si, pode possuir outras propriedades ainda desconhecidas e impossíveis de se demonstrar na análise histológica, contudo os valores de AST e ALT são testes mais sensíveis para o diagnóstico de doenças hepáticas [20].

Finalmente, nós demonstramos o efeito hepatoprotetor do extrato aquoso de *B. trimera*, com uma redução significativa nos níveis das enzimas hepáticas. Entretanto mais estudos serão necessários para avaliar e elucidar os efeitos hepatoprotetores de *B. trimera* a fim de determinar concentrações, tipos de extratos e vias adequadas de administração.

Referências

1. Bhandakar MR, Khan A. Antihepatotoxic effect of *Nymphaea stellata* Willd., against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 91: 61-64.
2. Orhan DD, Aslan M, Aktay G, Ergun E, Yesilada E, Ergun F. Evaluation of hepatoprotective effect of *Gentiana olivieri* herbs on subacute administration and isolation of active principle. *Life Sciences* 2003; 72: 2273-2283.
3. Simões CMO, Mentz LA, Schenkel EP, Irgang BE, Stehmann JR. Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul. Ed. UFRGS: Porto Alegre, 1986: 42-43.
4. Gené RM, Cartaña C, Adzet T, Marín E, Parella T, Cañigüeral S. Anti-inflammatory and Analgesic Activity of *Baccharis trimera*: Identification of its Active Constituents. *Planta Medica* 1996; 62: 232-235.
5. Torres LMB, Gamberini MT, Roque NF, Lima-Landman MT, Souccar C, Lapa AJ. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry* 2000; 55: 617-619.
6. Margeli AP, Papadimitriou L, Ninos S, Manolis E, Mykoniatis MG, Theocharis SE. Hepatic stimulator substance administration ameliorates liver regeneration in an animal model of fulminant hepatic failure and encephalopathy. *Liver International* 2003; 23: 171-178.
7. Galisteo M, Suárez A, Montilla MP, Utrilla MP, Jiménez J, Gil A, Faus MJ, Navarro MC. Antihepatotoxic activity of *Rosmarinus tomentosus* in a Model of

- Acute Hepatic Damage Induced by Thioacetamide. *Phytotherapy Research* 2000; 14: 522-526.
8. Bohlmann F, Zdero C. *Tetrahedron Lett* 1961; 28: 2419-2421.
 9. Ferretti-Alloise MG, Jacot-Guillarmond A, Naves YR. *Helv Chim Acta* 1970; 53: 201-208.
 10. Hodek P, Trafil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions* 2002; 139: 01-21.
 11. Soicke H, Leng-Peschlow E. Characterisation of Flavonoids from *Baccharis trimera* and their Antipatotoxic Properties. *Planta medica* 1987; 37-39.
 12. Kadarian C, Broussalis AM, Miño J, Lopez P, Gorzalczany S, Ferraro G, Acevedo C. Hepatoprotective Activity of *Achyrocline Satureioides* (LAM) DC. *Pharmacol Res* 2002; 45: 58-61.
 13. Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chou DS, Lin C, Su CH, Sheu JR. Antioxidative and Hepatoprotective Effects of *Antrodia camphorata* Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 3302-3308.
 14. Bruck R, Aeed H, Shirin H, Matas Z, Zaidel L, Avni Y, Halpern Z. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *Journal of Hepatology* 1999; 31: 27-38.
 15. Shankar K, Vaidya VS, Wang T, Bucci TJ, Mehendale HM. Streptozotocin-induced diabetic mice are resistant to lethal effects of thioacetamide hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2003; 188: 122-134.

16. Kumar G, Banu GS, Pappa PV, Sundararajan M, Pandian MR. Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 92: 37-40.
17. Ahmad A, Pillai KK, Najmi AK, Ahmad SJ, Pal SN, Balani DK. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 79: 35-41.
18. Janakat S, Al-Merie H. Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 83: 135-138.
19. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury.I. Performance Characteristics of Laboratory Tests. *Clinical Chemistry* 2000; 12: 2027-2049.
20. Suja SR, Latha PG, Pushpangadan P, Rajasekharan S. Evaluation of hepatoprotective effects of *Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook against carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 92: 61-66.

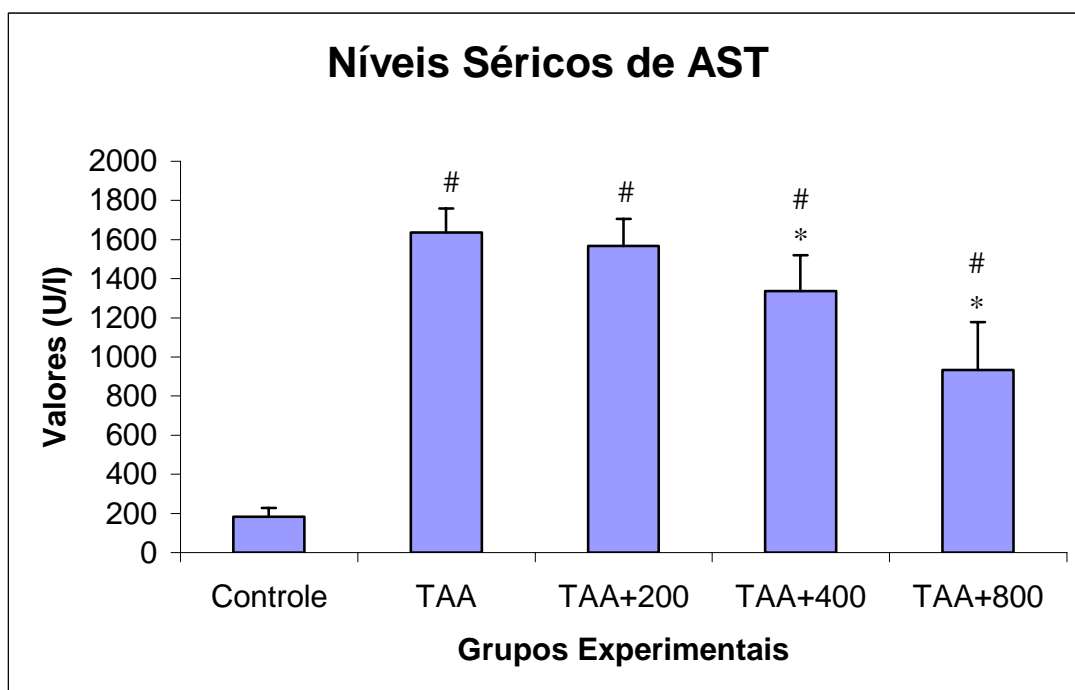


Fig 1- Níveis séricos de AST. Detalhes do experimento estão descritos em Materiais e Métodos. Resultados estão expressos em média \pm DP (n= 10, exceto em TAA+200 n=9 and TAA n=6). O asterisco indica níveis de AST significativamente menores, quando comparados com o grupo TAA. O símbolo # indica níveis de AST significativamente mais elevados, quando comparados com o grupo controle. ($p < 0,05$).

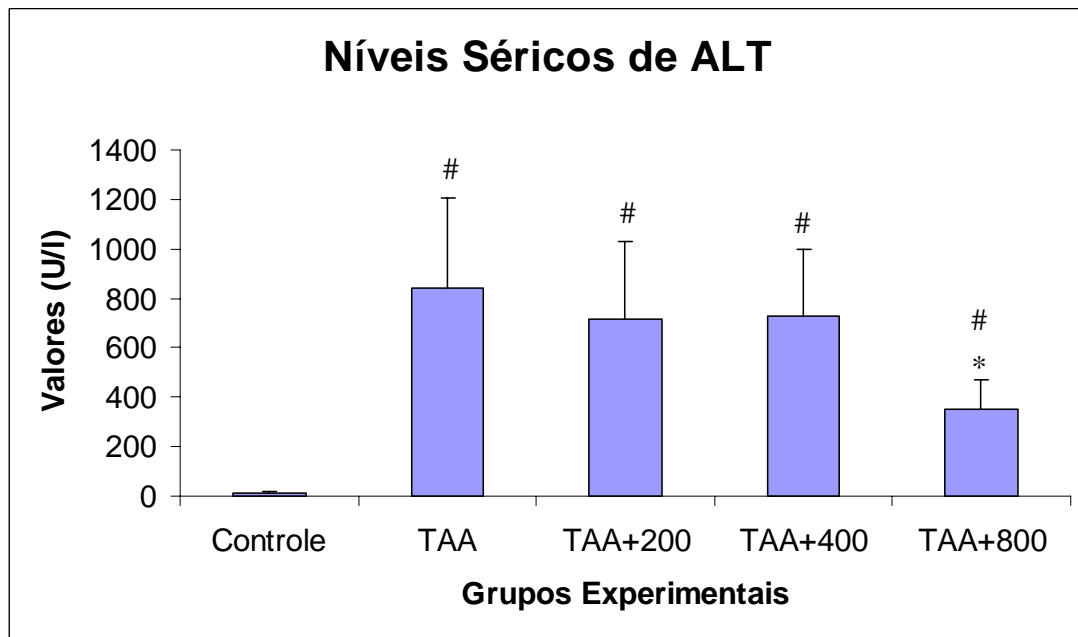


FIG 2- Níveis séricos de ALT. Detalhes do experimento estão descritos em Materiais e Métodos. Resultados estão expressos em média \pm DP (n= 10, exceto em TAA+200 n=9 and TAA n=6). O asterisco indica níveis de ALT significativamente menores, quando comparados com o grupo TAA. O símbolo # indica níveis de ALT significativamente mais elevados, quando comparados com o grupo controle. ($p < 0,05$).

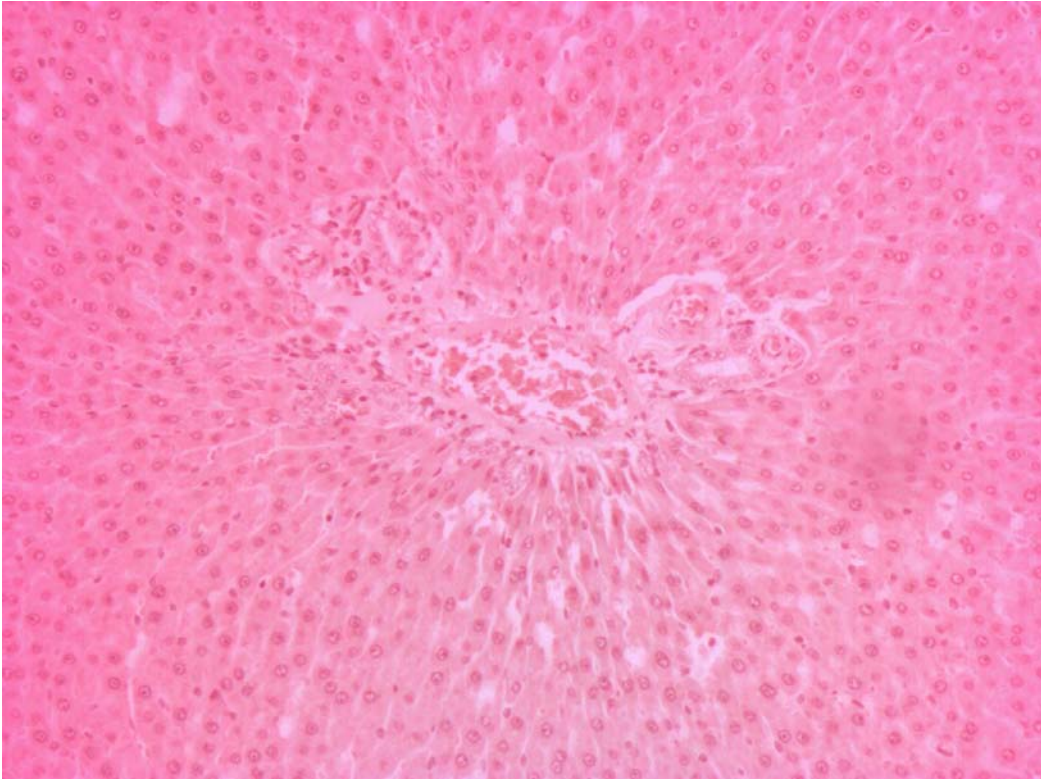


Fig.3 Amostras de fígado provenientes de animais do grupo controle, mostrando microarquiteta normal do parênquima hepático.(100X)

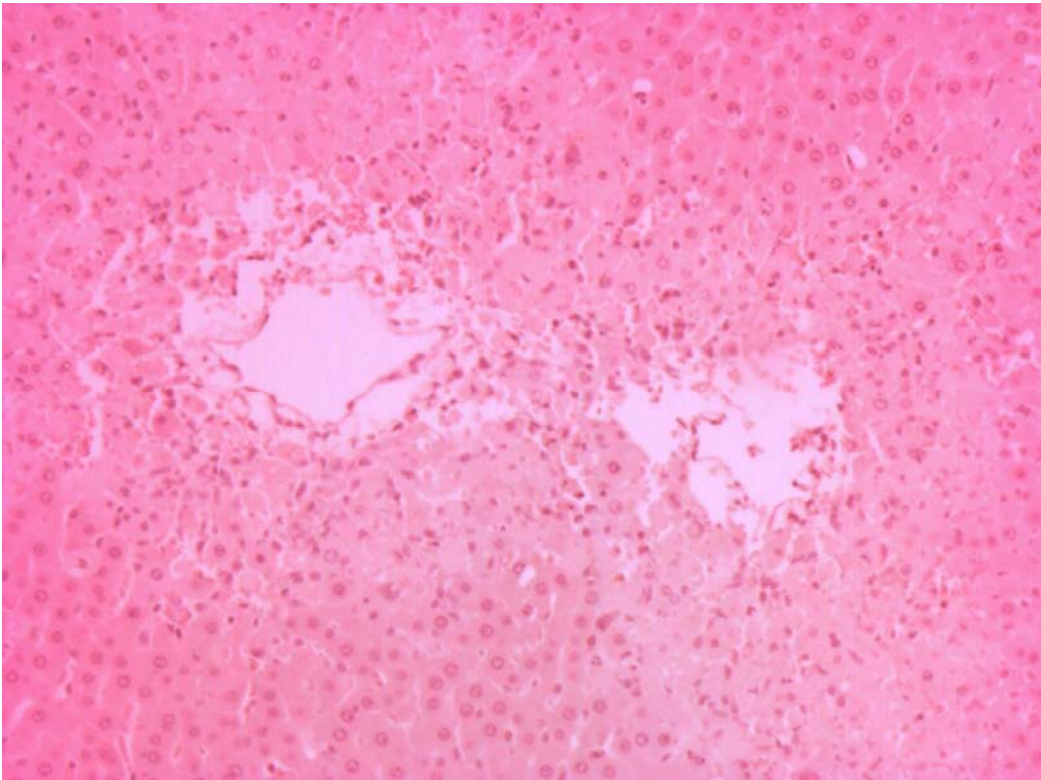


Fig.4 Amostras de fígado provenientes de animais do grupo TAA, mostrando algumas áreas com tecido necrótico, migração de leucócitos e ruptura da contiguidade das células.(100X)

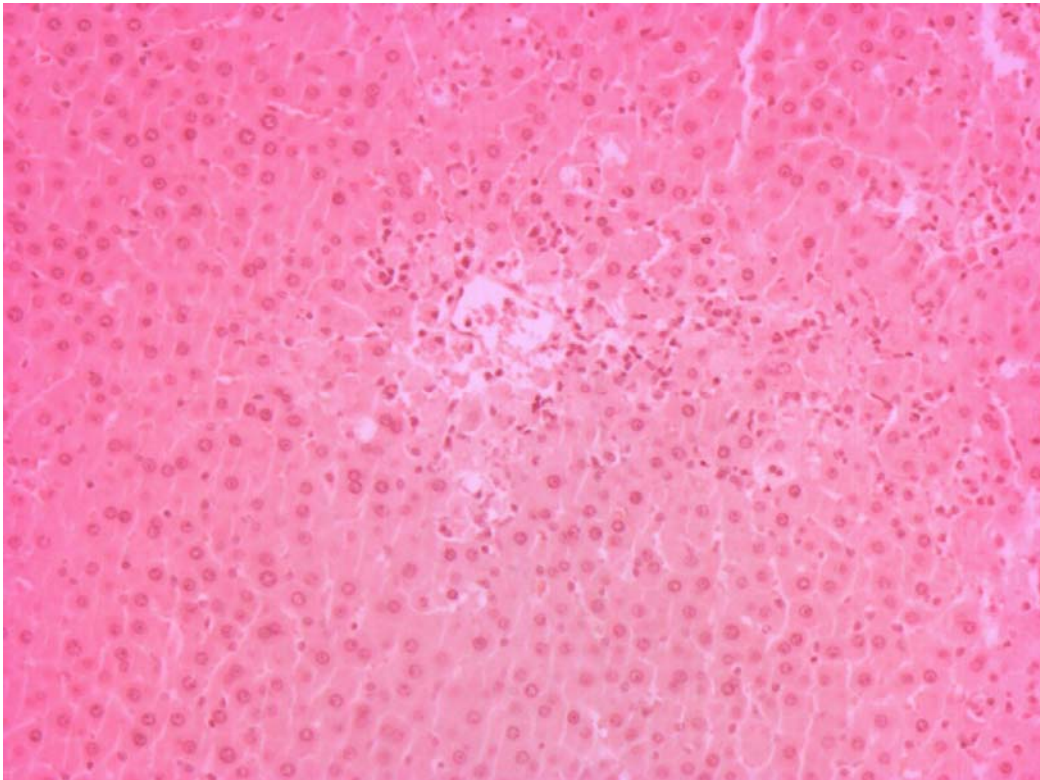


Fig. 5 Amostras de fígado dos animais do grupo TAA+200mg/kg, cuja análise histológica não difere significativamente do grupo TAA.(100X)

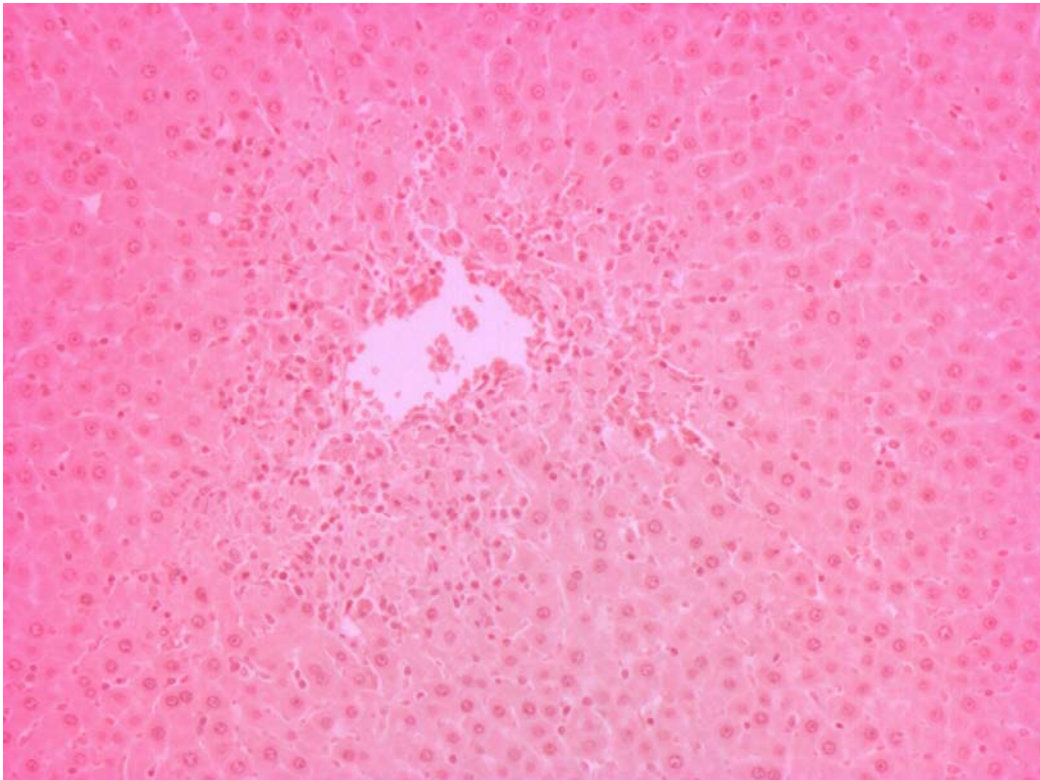


Fig. 6 Amostras de fígado dos animais do grupo TAA+400mg/kg, cuja análise histológica não difere significativamente do grupo TAA.(100X)

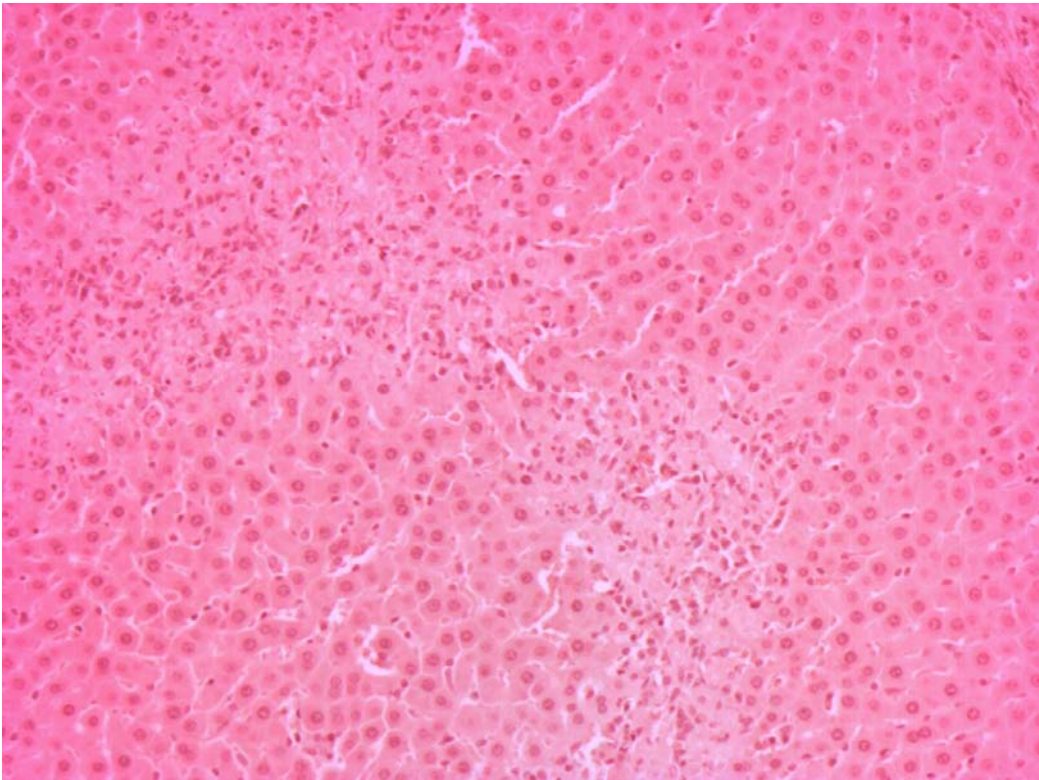


Fig. 7 Amostras de fígado dos animais do grupo TAA+800mg/kg, cuja análise histológica não difere significativamente do grupo TAA.(100X)

Objetivo Específico

2. Avaliar o efeito antiinflamatório do extrato aquoso de *B. trimera* em um modelo experimental de pleurisia induzida por Carragenina, em ratos Wistar.

3. Avaliar o efeito imunomodulador do extrato aquoso de *B. trimera* sobre células mononucleares de sangue periférico.

Antiinflammatory and Immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract in pleurisy induced in rats and linfoproliferation, in vitro.

Elisiane Lozza Paul, Eduardo Caberlon, Vanderlei Biolcchi, Roberto C. V. Santos,
Karla B. Moreira, Carolina M. A. Bastos , Jarbas Rodrigues de Oliveira.

Abstract

In recent years, plants have become important as a source of biologically active natural products. *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae) is a widespread South American plant known as “carqueja”. Medicinal teas prepared from the aerial parts of this plant are used in folk medicine among others in cases of the liver diseases and inflammatory processes. In the present study we evaluated the effects of aqueous extract of *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae), in the experimental inflammatory model of rat pleurisy induced by Carrageenan. The infusion of Carrageenan into the pleural cavity induce an influx of cells and an acute inflammation response characterized by a fluid accumulation in the pleural cavity with a large number of polymorphonuclear leukocytes and increase of proteins levels. The inflammation parameters were attenuated when *B. trimera*, in 200, 400 and 800 mg/kg was administrated intraperitoneally (IP) 30 minutes before the Carrageenan. These results show *B. trimera* has an anti-inflammatory effect, that may be explained in part to the inhibition of prostaglandin biosynthesis.

The immunomodulatory and cytotoxic effect of *B. trimera* was evaluated *in vitro*. The aqueous extract in concentration of 25 mg/ml, 50mg/ml and 100mg/ml, inhibits the T-lymphocytes proliferation stimulated with Phytohemagglutinin (PHA) however in these concentrations it presents cytotoxic activity. The data suggests an inhibition in lymphocytes proliferation wich could be considered as cytotoxic effect of the plant because off citotoxic activity of some components of *B trimera* .

Key words: *Baccharis trimera*, pleurisy, anti-inflammatory effect, immunomodulatory effect, citotoxic effect, T-lymphocytes

Introduction

In recent years, the clinical importance of herbal drugs has received considerable attention [1]. *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae) is a widespread South American plant known as “carqueja”. Medicinal teas prepared from the aerial parts of plant are used in folk medicine to treat gastrointestinal and liver diseases, angina, poor blood circulation, diabetes and inflammatory processes [2,3].

Experiments conducted with *B. trimera* extracts have been showed its posses the relaxant effect on vascular smooth muscle [4] , anti oxidant activity [5] and antihepatotoxic properties [6]. The known naturally occuring components of this plant are terpenes, carquejol, clerodane derivates, saponins, glycosides and flavonoids [6]. Recently, Gené *et al.* [7,8] reported anti-inflammatory activity produced intraperitoneally (IP) by *Baccharis trimera* aqueous extract and its butanolic fraction on Carrageenan-induced paw edema.

Inflammatory diseases including different types of rheumatic diseases are very common throughout the world [9]. The Carrageenan-induced pleurisy is a useful model for the characterization and screening of new anti-inflammatory drugs [10]. With this model, it is possible to evaluate simultaneously the total and differential cell count and the amount of exudate in a closed cavity [11,12].

The cells involved in the immune response, including lymphocytes and monocytes, can be modulated by various types of agents, including bacterial, fungal, plant and synthetic products [13]. Traditionally, immunomodulators are the

agents that can modulate the immune response and their effect may be stimulatory or suppressive [14]. Many primary and secondary metabolites of plants have been described as able to interfere in the functioning of immune system [13].

The aim of this study was to evaluate the effects of *Baccharis trimera* aqueous extract, on the experimental inflammatory model of pleurisy induced by Carrageenan in rats and to determine a possible immunomodulatory effect of aqueous extract of *B trimera* on T-lymphocytes proliferation.

Materials and Methods

Plant material

Samples of *B. trimera* were collected from Casa de Vegetação at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil, in summer. A voucher of specimen was deposited in the herbarium of PUCRS under number 9957 and authenticated by Dr Nelson Ivo Matzembacher, Department of Botany, PUCRS. Aerial parts of *B. trimera* (1g) were extracted in distilled water (5ml) at 80°C for 30 minutes. The crude extract (200mg/ml) was then filtered. The extract was prepared instead of procedure.

Animals

Wistar rats of both sexes 250-300g, were used throughout the experiments. The animals were kept in environmentally controlled room temperature under light/dark cycle of 12 hours and were allowed free access to food and water. The tests were conducted in accordance with the National Institute of Health Policy Guidelines on Animal Care.

Carrageenan-induced pleurisy

The pleurisy was induced by the injection of 0,2 ml of sterile saline solution containing Carrageenan (1%) (Sigma Chemical CO, USA), into the right pleural space of animals, under anaesthesia. Animals were sacrificed 4 hours later in an atmosphere of CO₂. The chest was than carefully opened and the pleural cavity was rinsed with 2 ml of saline solution containing 20 IU/ml of heparin (Liquemine ®,

Roche Diagnostics, Brazil). The exudate and rinse solution were removed by aspiration and the total volume was measured. Any exudate contaminated with blood was discarded. The amount of exudate was calculated by subtracting the volume injected (2 ml) from the total volume recovered. The total leukocytes and the differential cell count were measured on the automated blood count PENTRA ABX 60 (ABX Diagnostics, France). The protein levels were determined by colorimetry, using the technique of Biuret, using the equipment COBAS MIRA PLUS (Roche Diagnostics).

Experimental Groups

In the treated group of animals, *B. trimera* was infused as an intraperitoneal (IP) bolus (200, 400 or 800 mg/Kg), 30 minutes before the Carrageenan infusion. In the inflammation group of rats, saline solution was infused IP instead of Carrageenan intrapleural administration (IPL). In the control group, saline solution was infused IPL and IP.

Reagents

MTT (3-[4-5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was obtained from Acros Organics (USA). RPMI 1640 and Phytohemagglutinin (PHA) from Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo). Phycoll Paque™ Plus was purchased from Amersham Biosciences. Trypan blue 0.2% was obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo). 96 wells microtiter plates from Nunc (USA). Filters to

sterilization 0.22 μ m was obtained from Millex (Brazil). Garamicin sulfate 2,7 mg/ml from Schering-Plough (Brazil).

Preparation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

The PBMCs were isolated from the blood of healthy humans by gradient centrifugation. A total of 20 ml of the heparinized blood was diluted 1:2 with RPMI 1640. This mixture was overlaid in 7 ml partitions into 3 ml Lymphoprep and centrifuged at 800 g at room temperature for 20 minutes. The PBMCs, including T-lymphocytes, were harvested from the interface with a sterile transfer pipette and washed twice in the phosphate buffered saline (PBS).The cells were then resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with garamicin sulfate 2,7 mg/ml and 20% homologos serum at final cell concentration of $1,6 \times 10^6$ cell/ml. Platelet contamination of these preparations was < 1%; viability by Trypan Blue dye exclusion was uniformly greater than or equal to 95%.

Lymphoproliferation Assay

Phytohemagglutinin (PHA) was used for T-lymphocytes proliferation. Aqueous extract of *B trimera* was added in RPMI 1640 supplemented. Peripheral blood mononuclear cells ($1,6 \times 10^5$ cell/well) were plated directly with diferent concentrations of extract ranging from 200mg/ml to 12,5 mg/ml, wich were cultured in the presence of PHA (10 μ g/ml) in 96 wells microtiter plates, at 37°C in 5% CO₂ humidified incubator for 96 h.

Lymphocyte proliferation was determined by MTT assay as previously described [15]. Briefly, MTT was dissolved in RPMI 1640 at 5 mg/ml and added to all wells of an assay, and plates were incubated at 37 °C for 4 h. Isopropanol was added to all wells and mixed thoroughly to dissolve the dark blue crystals. After a few minutes, the plates were read on a Hyperion Microreader reader, using a test wavelength of 540 nm , a reference wavelength of 650nm. The results are presented as optical density by \pm SD and the three experiments were performed in triplicate.

Cytotoxic Assay

Aqueous extract of *B trimera* was dispensed in RPMI 1640 and added directly to PBMCs ($1,6 \times 10^5$ cell/well), which were incubated in 24 well microtiter plates at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. The cellular viability was performed by Trypan Blue dye exclusion after 96 h of the incubation. The results were presented as percentage by mean \pm SD and the three experiments were performed in triplicate.

Statistical Groups

Results were expressed by means \pm SD and statistical differences between groups were verified by analysis of variance (ANOVA) using the software SPSS version 11.5, complemented with Dunnett test. $P < 0,05$ was considered significant.

Results

All rats, which were treated with Carrageenan, developed acute pleurisy, characterised in the inflammation group, by the production of $1,07\text{ml} \pm 0,30$ of exudate. These raises were statistically significant when compared to the control group ($0,008\text{ml} \pm 0,028$) (Fig 1). The rats treated with, 400 and 800 mg/Kg, of *B. trimera* aqueous extract, 30 minutes before infusion of Carrageenan, have had the volume of pleural exudate attenuated ($0,58\text{ml} \pm 0,19$ and $0,52\text{ml} \pm 0,19$ respectively) (Fig 1).

The number of cells from the exudate in the inflammatory group is $31,12 \times 10^3 /\text{mm}^3 \pm 3,24$ (Fig 2) was significative higher when compared to the number of cells collected from the pleural space of control group ($2,52 \times 10^3 /\text{mm}^3 \pm 0,86$). The rats treated with 400 and 800 mg/Kg, of *B. trimera* aqueous extract, 30 minutes before infusion of Carrageenan, have had the total cells number of pleural exudate attenuated ($22,25 \times 10^3 /\text{mm}^3 \pm 4,08$ and $18,57 \times 10^3 /\text{mm}^3 \pm 1,48$ respectively) (FIG2).

The most of the leukocytes in pleural exudate were polymorphonuclear leukocytes (PMNs). In the inflammation group the percentage of PMNs was $80,26\% \pm 5,98$ and $49,96\% \pm 3,18$ of PMNs in the control group (Fig 3),

The rats treated with 200, 400 and 800 mg/Kg, of *B. trimera* aqueous extract, 30 minutes before infusion of Carrageenan, have had the percentage of PMNs attenuated ($72,77\% \pm 2,80$, $68,49\% \pm 3,08$ and $66,57\% \pm 2,20$ respectively) (Fig 3).

The proteins levels in the inflammation group are $1,58 \text{ g/dl} \pm 0,25$ and in the control group proteins levels are $0,16 \text{ g /dl} \pm 0,09$. When comparing the proteins levels in the group pre-treated with *B. trimera* 200, 400 and 800 mg/kg we can observe, a significant reduction on proteins levels ($1,24 \text{ g/dl} \pm 0,25$, $1,14 \text{ g/dl} \pm 0,30$ and $0,94 \text{ g/dl} \pm 0,12$ respectively). (Fig 4)

The immunomodulatory effect of *B trimera* was evaluated on T-lymphocytes proliferation *in vitro*, in presence of PHA ($10\mu\text{g/ml}$). Results present in Fig.5 show that *B trimera* at concentrations 25 mg/ml, 50mg/ml and 100mg/ml to decreased significantly proliferation of these cells ($p < 0.05$).

To determine whether the inhibitory effect of *B trimera* on lymphoproliferation was due to cellular death, the cellular viability was investigated. As show in Fig 6, *B trimera* reduced significantly the cell viability in concentrations 100mg/dl, 50 mg/dl and 25 mg/dl ($p < 0.05$).

Discussion

The injection of Carrageenan into the pleural cavity of rats elicited an acute inflammatory response characterized by the accumulation of fluid (edema) with a large amount of polymorphonuclear leukocytes (PMNs). During acute inflammation serum proteins and leukocytes migrate to areas of tissue injury. Recruitment of cells to inflammatory sites is dependent on the release of vasoactive and chemotactic factors that increase regional blood flow, increase microvascular permeability and promote the migration of leukocytes from the intravascular space into the tissues [16]. Lung inflammation is usually characterized by extensive infiltration of pulmonary tissue by PMNs [17].

Analysis of the results in the present study indicate that *B. trimera* aqueous extract shows anti-inflammatory action in the experimental model of rat pleurisy induced by Carrageenan. Edema and neutrophil infiltration in lung tissue were attenuated when *B. trimera* in 400 and 800 mg/kg was administered IP 30 minutes before the Carrageenan. The extract in these doses caused significant inhibitory effects in both: cell influx and fluid leakage into the pleural cavity as well as in protein levels. Assembled these results confirm the studies of Gené *et al.* [7], with butanolic fraction (BT II), derived from the aqueous crude extract prepared from aerial parts of *B. trimera*, which produced a strong inhibition of carrageenan and dextran-induced paw edema. The authors suggest that the anti-inflammatory activity of *B. trimera* on Carrageenan paw edema is due, at least partly, to prevention of prostaglandins biosynthesis via cyclooxygenase blockade and the

ability of this fraction to reduce dextran-induced swelling indicates that other mechanisms may be also involved [4].

Advances made in recent years in order to understanding the cellular and molecular basis of immune response and with the identification of small peptides capable of regulating this process it is now possible to alter this condition in favour of healthy state [14]The therapeutic efficiency of some herbs may in part be mediated via their influence on the immune response and it has shown that some of these plants can affect the immune reactions through their anti –inflammatory actions [18].

Recent findings have shown that some plants contain useful cytotoxic compounds in response to fungal infection or with antitumoral activity. Several species of *Baccharis* contain macrocyclic tricothecenes, which show high toxicity towards eucariotic organisms. [19]

This study demonstred that aqueous extract of *B trimera* has an important activity on T-lymphocyte proliferation due to cellular death. This activity could be explained by the presence of flavonoids, which have a pronounced antioxidant activity and abilities to modulate several enzymes and cell receptors.[20]. In addition, flavonoids inhibit phosphodiesterases involved in specific cell activation .

We demonstrated that *B. trimera* aqueus extract (200,400 and 800 mg/kg) has an anti-inflammatory effect on rat pleurisy induced by Carrageenan. This effect is characterized by inhibition of both total and differential leukocyte influx and exudation and the reduction of proteins levels in the inflammatory exudate.

However, the mechanisms of action of *B. trimera* are not clear, but may be explained in part by their ability to inhibit the synthesis of prostaglandins.

The data obtained in the present study demonstrated various functional activities of the plant, which affected cell stimulation or inhibitions and perhaps indicates that chemically characterizations as well as more immunological *in vitro* and *in vivo* studies are needed to establish the relevance of the inhibitory effect on T-lymphocytes proliferation, cytotoxicity and the therapeutic usefulness of *B. trimera*.

Referências

1. Geetha S, Sai Ram M, Singh V, Ilavazhagan G, Sawhney RC. 2002. Antioxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*)-and in vitro study. *J Ethnopharmacology* **79**: 373-378.
2. Corrêa MP. 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, (1st edn). Imprensa Nacional, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro.
3. Brandão Torres LM, Gamberini MT, Roque NF, Lima-Landman MT, Souccar C, Lapa AJ. 2000. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry* **55**: 617-619.
4. Torres MB, Gamberini MT, Roque NF, *et al* Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*. 2000; **55**: 617-619
5. De Las Heras B, Slowing K, Benedi J, *et al*. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *J Ethnopharmacology*. 1998; **61**:161-166.
6. Soicke H, Leng-Peschlow A, Characterisation of Flavonoids from *Baccharis trimera* and their Antihepatotoxic Properties. *Planta Medica* 1987: 37-39.
7. Gené RM, Marin E, Adzet T. 1992. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. *Planta Med* **58**: 37-39.
8. Gené RM, Cartañá C, Adzet T, Marin E, Parella T, Cañigüeral S. 1996. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. *Planta Med* **62**: 232-235.
9. Srinivasan k, Muruganandan S, Lal J, Chandra S, Tandan SK, Ravi Prakash V. 2001. Evaluatin of anti-inflammatory activity of *Pongamia pinnata* leaves in rats. *J ethnopharmacology* **78**: 151-157.
10. Brito FD. 1989. Pharmacological methods in the control of inflammation (1st edn). Rhone Poulenc LTD: Degenham.
11. Lo TN, Almeida AP, Braven MA. 1982. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. *J Pharmacol Exp Ther* **221**: 261-267.

12. Saleh TS, Calixto JB, Medeiros IS. 1996. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Br J Pharmacol* **118**: 811-819.
13. Souza-Fagundes EM, Gazzinelli G, Parreira GG, *et al.*. In vitro activity of labdane diterpene from *Alomia myriadenia* (Asteraceae): immunosuppression via induction of apoptosis in monocytes. *International Immunopharmacology*. 2003; **3**: 383-392.
14. Dutta RC, Peptide immunomodulators versus infection; an analysis. *Immunology Letters*. 2002, **0**: 1-9.
15. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; **65**: 55-63
16. Suffredini AF, Fantuzzi G, Badolato R, Oppenheim JJ, O`Grady NP. 1999. New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol* **19**: 203-214.
17. Cuzzocrea S, Mazzon E, Sautebin L, Dugo L, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP. 2002. Protective effects of Celecoxib on lung injury and red blood cells modification induced by carragenan in the rat **63**: 785-795.
18. Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *J. Ethnopharmacology*. 2000; **72**: 167-172.
19. Mongelli E, Desmarchelier C, Rodrigues TJ, *et al.* In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. *J. Ethnopharmacology*. 1997; **58**: 157-163.
20. Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*. 2002; **139**: 1-21.

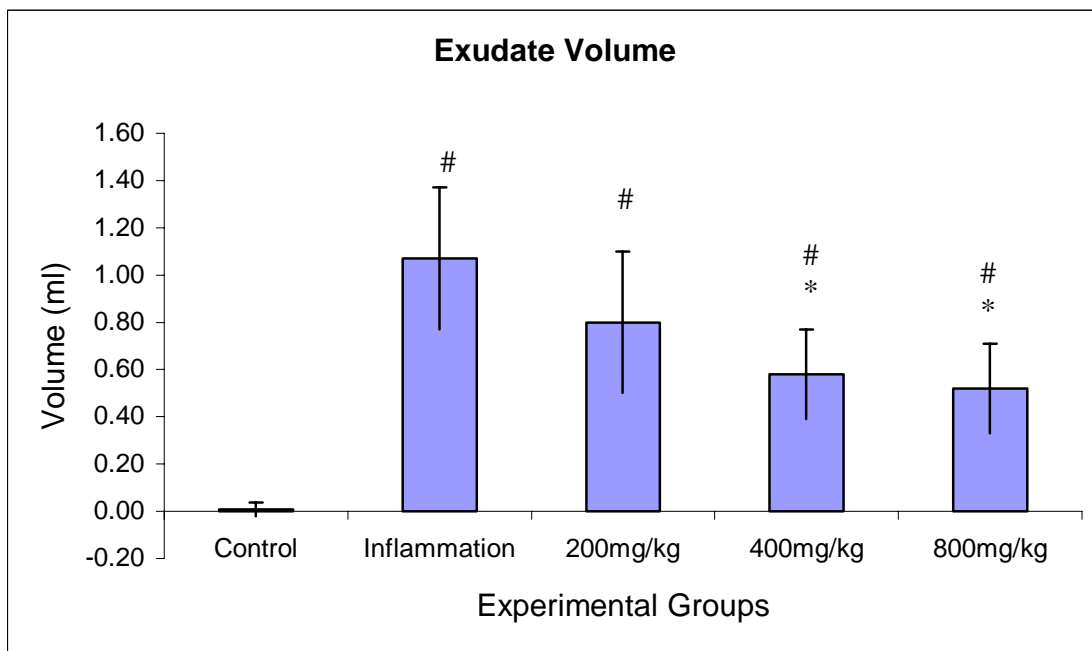


Figure 1: Effects of *B. trimera* on exudate volume leakage in Carrageenan-induced pleurisy in rats. Treatment details are under Material and Methods. Results are expressed as means \pm SD. The asterisk shows that exudate volume are significantly lower than in the group inflammation. The symbol # indicates exudate volume is significantly higher than control group ($p < 0.05$).

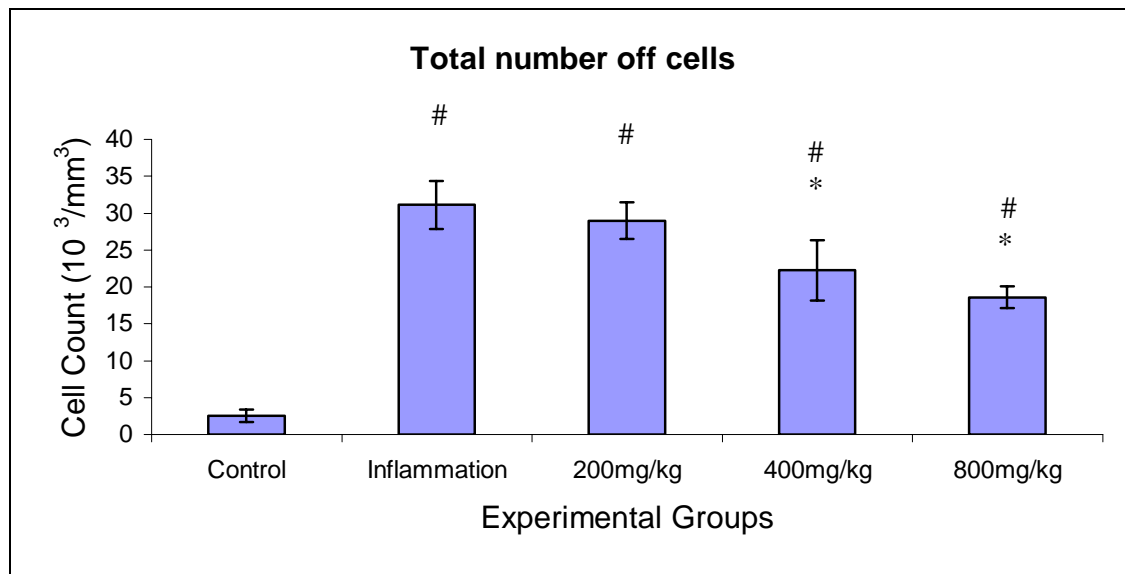


Figure 2 Effects of *B. trimera* on number of cells on exudate in carrageenan-induced pleurisy in rats. Treatment details are under Material and Methods. Results are expressed as means \pm SD. The asterisk shows the total cells number are significantly lower than in the group inflammation. The symbol # shows the total cells number is significantly higher than control group ($p < 0.05$).

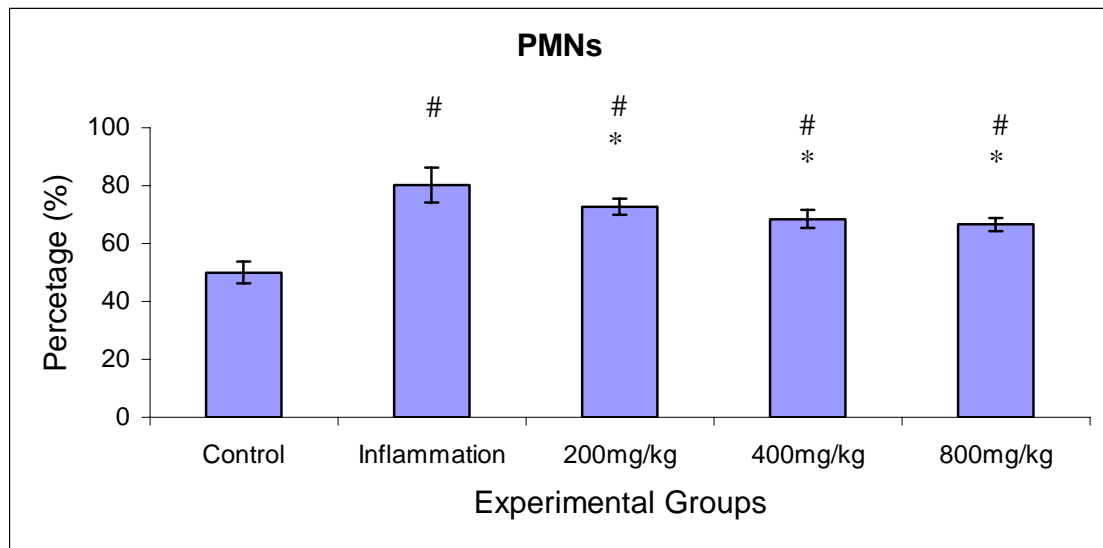


Figure 3 Effects of *B. trimera* on percentage of polymorphonuclear leukocytes on exudate in carrageenan-induced pleurisy in rats. Treatment details are under Material and Methods. Results are expressed as means \pm SD. The asterisk shows the percentage of PMNs are significantly lower than in the group inflammation. The symbol # shows the percentage of PMNs is significantly higher than control group ($p < 0.05$).

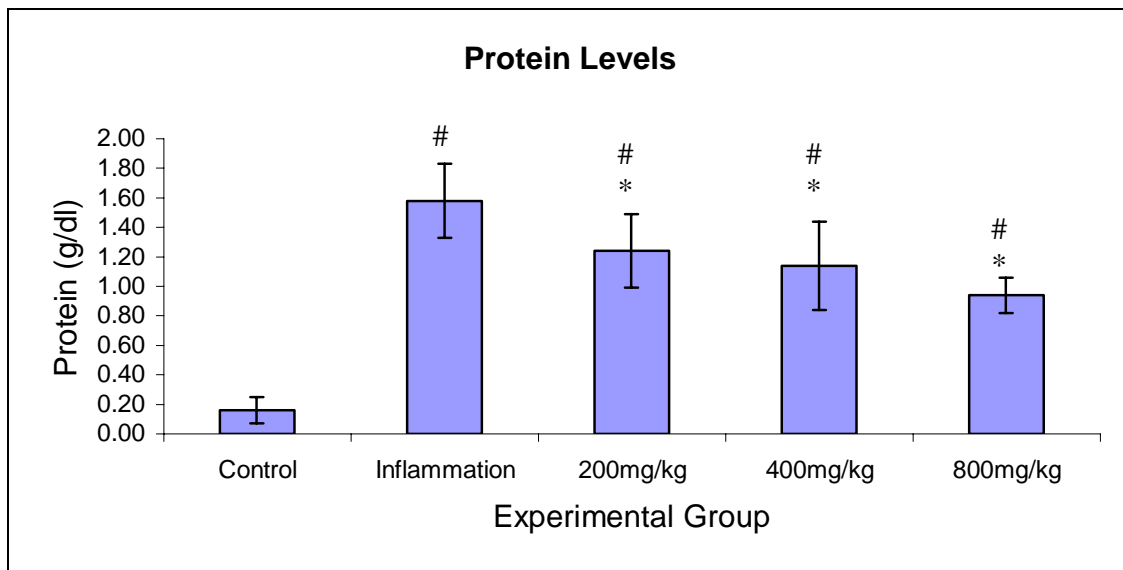


Figure 4 Effects of *B. trimera* on protein levels on exudate in carrageenan-induced pleurisy in rats. Treatment details are under Material and Methods. Results are expressed as means \pm SD. The asterisk shows the protein levels are significantly lower than in the group inflammation. The symbol # shows the protein levels is significantly higher than control group ($p < 0.05$).

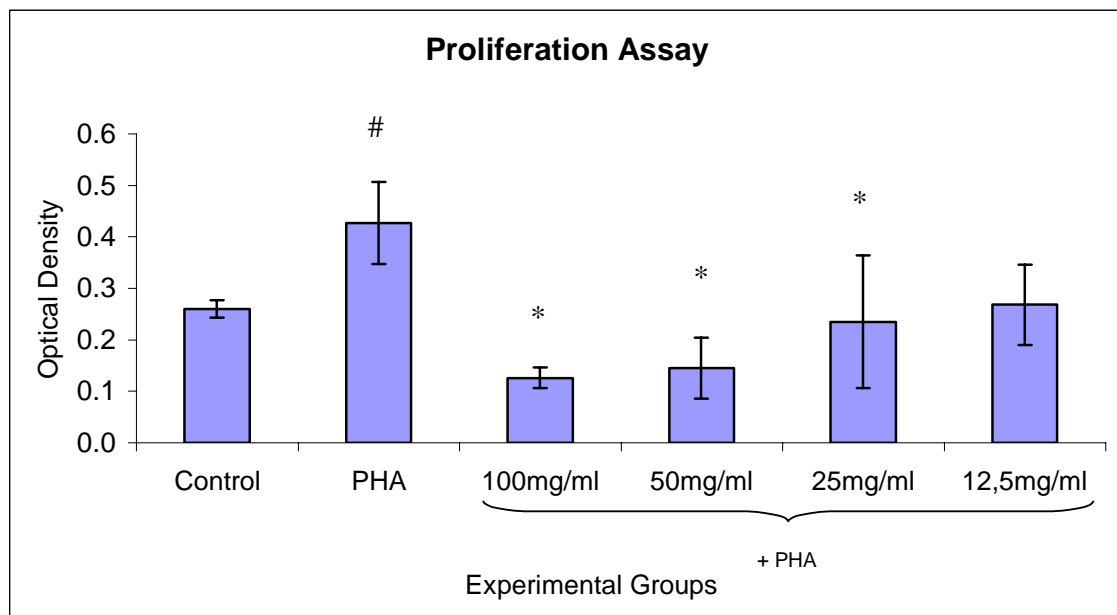


Fig. 5 Immunomodulatory effect of *B. trimera* on T-lymphocytes proliferation in vitro. Results are expressed as O.D. means \pm SD. Concentrations at 100, 50 and 25 mg/ml showed a decreased significantly proliferation of these cells represented by asterisk ($p < 0.05$). The symbol # shows the difference between the PHA group and the control group ($p < 0.05$).

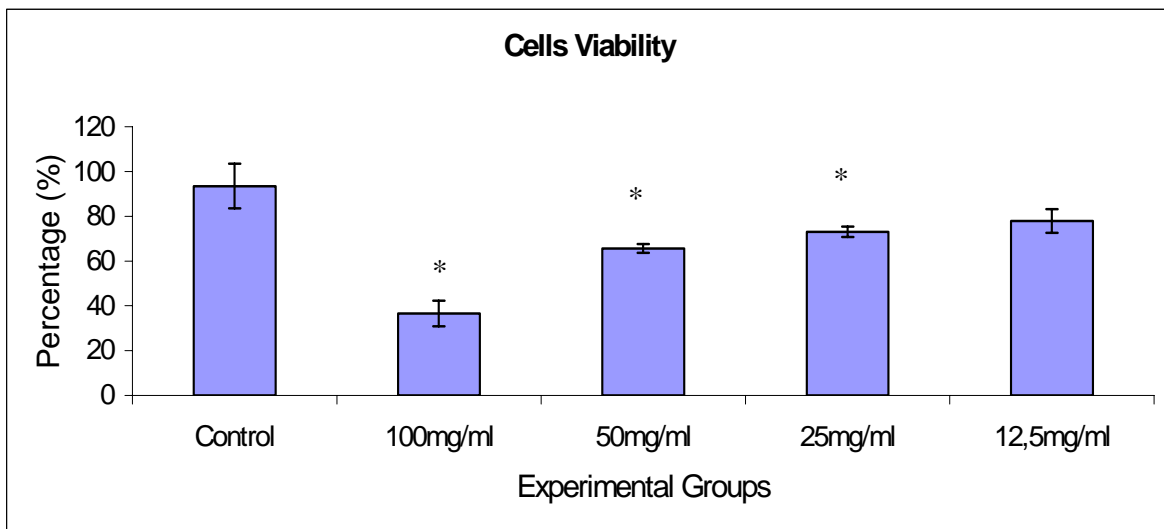


Fig.6 Effect of *B. trimera* on cell viability on T-lymphocytes in vitro. Results are expressed as means (% cells viability) \pm SD. Concentrations between 100, 50 e 25 mg/ml showed a decreased significantly on cell viability represented by asterisk ($p < 0.05$).

Efeito antiinflamatório e imunomodulador do extrato aquoso de *Baccharis trimera* na pleurisia induzida em ratos e na linfoproliferação *in vitro*.

Elisiane Lozza Paul, Eduardo Caberlon, Vanderlei Biolcchi, Roberto C. Viana, Karla B. Moreira, Carolina M. A. Bastos , Jarbas Rodrigues de Oliveira.

Resumo

As plantas possuem grande importância como fonte de produtos naturais biologicamente ativos. *Baccharis trimera* (Less) DC Asteraceae é uma planta nativa da América do Sul e popularmente conhecida como carqueja, cujos chás são usados na medicina popular, em doenças hepáticas e processos inflamatórios. No presente estudo foi avaliado o efeito antiinflamatório do extrato aquoso de *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae), em um modelo experimental de inflamação, a pleurisia induzida por Carragenina em ratos. A administração de Carragenina na cavidade pleural induz a uma resposta inflamatória aguda, caracterizada por acúmulo de fluido na cavidade, com grande número de leucócitos polimorfonucleares e aumento nos níveis de proteínas. Os parâmetros inflamatórios foram atenuados quando foi administrado, intraperitoneal (IP), extrato aquoso de *B. trimera* (BTE) nas concentrações de 200, 400 e 800 mg/kg, 30 minutos antes da Carragenina. Estes resultados mostram que *B. trimera* possui um efeito antiinflamatório, que pode ser explicado, em parte, por sua capacidade de inibição da síntese de prostaglandinas.

Os efeitos imunomodulador e citotóxico de *B trimera* foram avaliados *in vitro*. O extrato aquoso, em concentrações de 25mg/ml, 50mg/ml e 100mg/ml inibiu a proliferação dos linfócitos estimulada por Fitohemaglutinina (PHA), entretanto nestas concentrações o extrato apresentou ação citotóxica. Os dados demonstram uma diminuição na proliferação linfocitária causada pelos componentes de *B. trimera*, que pode ser devido a efeitos citotóxicos da planta.

Palavras-chave: *Baccharis trimera*, pleurisia, efeito antiinflamatório, efeito imunomodulador, efeito citotóxico, linfócitos T.

Introdução

Nos últimos anos, a importância clínica das plantas medicinais tem recebido considerável atenção [1]. *Baccharis trimera* (Less) DC (*Asteraceae*) é uma planta largamente conhecida na América do Sul como carqueja e usada na medicina popular no tratamento de doenças hepáticas, gastrointestinais, angina, má circulação, diabetes melito e processos inflamatórios.[2,3]

Experimentos realizados com extratos de *B. trimera* têm mostrado que esta planta possui efeito relaxante da musculatura lisa vascular [4], atividade antioxidante [5] e propriedades hepatoprotetoras [6]. Ocorrem naturalmente nesta planta terpenos, carquejol, derivados clerodane, saponinas, glicosídeos e flavonóides [6]. Recentemente, Gené *et al.* [7,8], demonstraram a atividade antiinflamatória produzida pelo extrato aquoso de *B. trimera* (BTE), em edema de pata induzido por Carragenina.

As doenças inflamatórias, incluindo diferentes tipos de reumatismo, são muito comuns ao redor do mundo.[9] A indução de pleurisia por Carragenina é um modelo útil para caracterização e triagem de novas drogas antiinflamatórias [10], pois permite avaliar simultaneamente a contagem total e diferencial de células e o volume de exsudato contido na cavidade [11,12].

A resposta inflamatória ocorre em fases distintas, mediadas por diferentes mecanismos, sendo a fase aguda caracterizada pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, a fase subaguda caracterizada pela infiltração de

leucócitos e células fagocíticas e a fase crônica proliferativa, caracterizada por degeneração tecidual e fibrose.

Durante a inflamação, linfócitos devem proliferar abundantemente antes que possam se diferenciar em células efetoras funcionais, portanto a análise da proliferação induzida de linfócitos apresenta grande importância.

As células envolvidas na resposta imune podem ser moduladas por vários tipos de agentes, incluindo bactérias, fungos, plantas e produtos sintéticos [13]. Tradicionalmente, imunomoduladores são agentes com capacidade de modular a resposta imune e seu efeito pode ser estimulatório ou supressivo. [14]. Vários metabólitos primários ou secundários de plantas têm sido descritos como capazes de interferir em diferentes funções do sistema imune.[13]

Os ensaios de linfoproliferação utilizando mitógenos policlonais, têm sido largamente utilizados para avaliar a ação imunoregulatória de várias substâncias, porém dados obtidos *in vitro* não são diretamente equivalentes às respostas obtidas *in vivo*, devendo ser interpretados de forma muito criteriosa.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato aquoso de *B. trimera*, no modelo experimental de inflamação usando Carragenina para induzir pleurisia em ratos e determinar o possível efeito imunomodulador do extrato aquoso de *B. trimera* na proliferação de linfócitos.

Materiais e Métodos

Matéria Vegetal

Amostras de *B. trimera* foram coletadas no verão, na Casa de Vegetação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Uma amostra da espécie foi depositada no Herbário da PUCRS, sob número 9957 e autenticada pelo Dr. Nelson Ivo Matzembacher, do Departamento de Botânica, PUCRS. Partes aéreas da planta (1g) foram extraídas em água destilada (5ml) a 80°C durante 30 minutos, obtendo-se o extrato aquoso de *Baccharis trimera* (BTE), que foi posteriormente filtrado. A partir do BTE cuja concentração é de 200mg/ml foram obtidas as concentrações utilizadas no experimento. O extrato foi preparado momentos antes dos experimentos.

Animais

Ratos Wistar de ambos os sexos, pesando entre 250 a 300g foram usados para a realização dos experimentos. Os animais foram mantidos em locais com temperatura controlada, ciclos de luz/escuro de 12 horas e com livre acesso a alimentação e água. Os testes foram conduzidos de acordo com normas e condutas éticas.

Indução da Pleurisia por Carragenina

A pleurisia foi induzida pela injeção de 0,2 ml de solução salina estéril contendo Carragenina 1% (Sigma Chemical CO, USA) no espaço pleural direito dos animais, sob anestesia. Após quatro horas os animais foram sacrificados em atmosfera de CO₂, o peito foi cuidadosamente aberto e a cavidade pleural foi

lavada com 2 ml de solução salina contendo heparina 20 UI/ml (Liquemine® Roche Diagnostics, Brasil). O volume de exsudato foi calculado, subtraindo-se o volume injetado para lavagem (2ml) do volume total coletado, por aspiração. Qualquer exsudato contaminado com sangue foi descartado.

A contagem total e diferencial de leucócitos foi processada em contador automático de células sanguíneas, o PENTRA ABX 60 (ABX Diagnostics, França). A dosagem de proteínas foi realizada por método colorimétrico, Biureto, usando o equipamento COBAS MIRA PLUS (Roche Diagnostics).

Grupos Experimentais.

Os grupos de animais tratados receberam injeção intraperitoneal (IP) de extrato aquoso de *B. trimera* nas concentrações de 200, 400 ou 800mg/kg de peso, 30 minutos antes da indução da pleurisia pela Carragenina. Os ratos do grupo de inflamação receberam injeção IP de solução salina 30 minutos antes da indução da pleurisia pela Carragenina, enquanto que ratos do grupo controle receberam solução salina administrada IP e intrapleural (IPL). Todos os ratos foram mortos quatro horas após a indução da pleurisia e o exsudato coletado para análise.

Reagentes

MTT (3-[4-5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) foi obtido de Acros Orgânica(USA). RPMI 1640, Fitohemaglutinina (PHA) e Azul de Trypan 0.2% foram obtidos de Sigma Chemical Co. Ficoll Paque™ Plus obtido da Amersham Biosciences. Microplacas foram obtidas de NUNC (USA). Unidades filtrantes estéreis 0.22µm foram obtidos de Millex (Brasil) e sulfato de Garamicina 2,7 mg/ml de Schering-Plough.

Preparação das Células Mononucleares de Sangue Periférico

As células mononucleares foram isoladas do sangue periférico de indivíduos sadios por gradiente de centrifugação. Um total de 20 ml de sangue heparinizado foi diluído 1:2 em RPMI 1640, a 7 ml desta mistura foram adicionados 3 ml de Ficoll. Esta diluição foi centrifugada a 800 g em temperatura ambiente, durante 20 minutos. As células mononucleares, incluindo os linfócitos T, foram removidas da interface através de pipeta estéril e lavadas duas vezes com solução salina tamponada (PBS). As células foram ressuspendidas a uma concentração final de $1,6 \times 10^6$ cel/ml em meio RPMI 1640, suplementado com sulfato de gamicina 2,7 mg/ml e 20% de soro homólogo. A contaminação com plaquetas desta preparação foi < 1% e a viabilidade medida pela exclusão de Azul de Trypan foi maior ou igual a 95%.

Ensaio de Linfoproliferação

O mitógeno Fitohemaglutinina foi usado para a proliferação de linfócitos. O extrato aquoso de *B. trimera* foi adicionado ao meio RPMI suplementado e as células mononucleares foram dispensadas diretamente nas diferentes concentrações de extrato, variando de 100mg/ml até 6,25 mg/ml, que foram cultivadas em presença de PHA (10µg/ml) em microplacas, a 37°C em 5% de CO₂ em incubadora umidificada durante 96 h.

A proliferação dos linfócitos foi determinada pelo ensaio de MTT, como descrito previamente [15]. O MTT foi dissolvido em RPMI 1640 a 5mg/ml e adicionado a todas as cavidades do ensaio. As placas foram incubadas a 37°C por 4h e depois foi adicionado isopropanol a fim de dissolver os cristais azuis

formados. Depois de alguns minutos as placas foram lidas em leitora óptica Hyperon Microreader, usando filtro com comprimento de onda 540nm e filtro de referência 650nm. Os resultados estão apresentados em média de densidade óptica \pm DP de três experimentos que foram realizados em triplicata .

Ensaio de Citotoxicidade

O extrato aquoso de *B. trimera* foi dispensado em RPMI 1640 e adicionado diretamente às células mononucleares ($1,6 \times 10^6$ cel/ml), que foram incubadas em microplacas, a 37°C em 5% de CO₂ em incubadora umidificada durante 96 h. A viabilidade celular foi medida por exclusão do Azul de Trypan, os resultados foram expressos em percentagem de células viáveis \pm DP de três experimentos que foram realizados em triplicata.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm DP. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas pela análise de Variância (ANOVA) complementada pelo teste Dunnet, utilizando-se o programa SPSS versão 11.5 . P < 0,005 foi considerado significativo.

Resultados

Todos os ratos tratados com Carragenina, desenvolveram pleurisia aguda caracterizada por produção de exsudato. No grupo inflamação, o volume de exsudato foi de $1,07\text{ml} \pm 0,30$, que foi significativamente maior do que o grupo controle ($0,008\text{ml} \pm 0,028$) (Fig.1). Esta exsudação foi atenuada significativamente com o pré-tratamento com o BTE nas concentrações de 400 mg/Kg ($0,58\text{ml} \pm 0,198$) e 800 mg/Kg ($0,52\text{ml} \pm 0,198$) (Fig 1).

O número total de leucócitos no exsudato do grupo inflamação ($31,12 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 3,24$) foi significativamente maior que o grupo controle ($2,52 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 0,86$). O pré-tratamento com BTE nas concentrações de 400 e 800 mg/Kg atenuou significativamente o aumento do número de leucócitos, provocado pela Carragenina ($22,25 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 4,08$ e $18,57 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 1,48$, respectivamente) (Fig 2).

Os leucócitos presentes no líquido pleural do grupo controle apresentaram $49,96\% \pm 3,18$ de PMNs. Este percentual aumentou significativamente nos ratos do grupo inflamação, que apresentaram $80,26\% \pm 5,98$. O pré-tratamento com BTE diminuiu significativamente o percentual de PMNs em comparação ao grupo inflamação, mostrando que os ratos pré-tratados com BTE 200mg/Kg apresentam $72,77\% \pm 2,80$ de PMNs, com BTE 400mg/Kg apresentam $68,49\% \pm 3,08$ e com BTE 800mg/Kg apresentam $66,57\% \pm 2,20$ (Fig 3).

Um dos parâmetros característicos do exsudato é a sua concentração de proteínas. O tratamento com Carragenina provocou um aumento significativo na

concentração de proteínas do grupo inflamação (1,58g/dl \pm 0,25) quando comparado com o grupo controle (0,16g/dl \pm 0,09). Nos grupos que foram pré-tratados com BTE os níveis proteicos foram significativamente mais baixos, apresentando uma concentração de proteínas de 1,24 g/dl \pm 0,25 para o grupo que recebeu BTE 200 mg/Kg; 1,14 g/dl \pm 0,30 para o grupo que recebeu BTE 400mg/Kg e 0,94 g/dl \pm 0,12 para o grupo que recebeu BTE 800mg/Kg (Fig. 4).

O efeito do extrato aquoso de *B. trimera* na proliferação de linfócitos *in vitro*, estimulada pela PHA é apresentado na Fig. 5, que mostra que as concentrações de 100, 50 e 25 mg/ml de BTE reduzem significativamente a linfoproliferação. ($p < 0,05$). Para determinar se este efeito inibidor era devido à morte celular, a viabilidade celular foi avaliada.

A Fig. 6 mostra uma redução significativa da viabilidade celular pelo extrato de *B. trimera*, nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/ml. ($p < 0,05$).

Discussão

A injeção de Carragenina na cavidade pleural de ratos causa uma resposta inflamatória aguda. Durante o processo inflamatório, água, proteínas plasmáticas e leucócitos migram para as áreas de dano tecidual, sendo este recrutamento das células inflamatórias dependente de fatores vasoativos e quimiotáticos, que aumentam o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular promovendo a exudação dos leucócitos da circulação para os tecidos. [16] A inflamação pulmonar é caracterizada usualmente por extensa infiltração do tecido por PMNs.[17]

Os resultados deste estudo indicam que o extrato aquoso de *Baccharis trimera* exibe ação antiinflamatória no modelo experimental de pleurisia induzida por Carragenina em ratos. O acúmulo de líquido e a infiltração de leucócitos no tecido pulmonar foram atenuados quando foi administrado o extrato de *B. trimera* nas concentrações de 400 e 800 mg/Kg, 30 minutos antes da injeção de Carragenina. Nestas doses o extrato causa uma significativa inibição do afluxo de células e redução de líquido dentro da cavidade pleural. Além disso, o extrato aquoso de *B. trimera*, diminui significativamente o afluxo de PMNs e proteínas nas três doses estudadas. Estes resultados confirmam estudos anteriores [7] onde uma fração butanólica derivada do extrato aquoso de *B. trimera*, produziu uma forte inibição do edema de pata induzido por Carragenina e Dextran. Os autores sugerem que a atividade antiinflamatória de *B. trimera* é devida, pelo menos em parte, a alterações na biossíntese de prostaglandinas via bloqueio da Cyclooxygenase, mesmo que outros mecanismos também pareçam estar

envolvidos, entretanto o mecanismo deste efeito antiinflamatório não está claro, necessitando estudos mais aprofundados.

Avanços feitos nos últimos anos no entendimento das bases celulares e moleculares da resposta imune e na identificação de pequenos peptídeos capazes de regular este processo, tornam possível alterar a resposta imune em favor do estado de saúde [14]. A eficiência terapêutica de algumas ervas pode ser mediada em parte por sua influência na resposta imune, o que pode ocorrer porque muitas plantas podem afetar esta resposta através de sua capacidade antiinflamatória [18].

Achados recentes têm demonstrado que algumas plantas possuem componentes citotóxicos que podem ser usados na resposta a infecções fúngicas ou ainda que possuem atividade antitumoral. Várias espécies de *Baccharis* contêm tricotecenos macrocíclicos que apresentam alta toxicidade frente a organismos eucariotos [19].

Este estudo demonstrou que *B. trimera* possui efeito antiinflamatório na pleurisia induzida por Carragenina em ratos, caracterizado pela diminuição na contagem total de células, na percentagem de PMNs e na concentração proteica do exsudato coletado. Apesar destes resultados, observou-se no ensaio *in vitro*, que as concentrações do extrato que inibiam a proliferação estimulada de linfócitos eram as mesmas que diminuíam significativamente a viabilidade celular.

Esta atividade citotóxica poderia ser explicada pela presença de flavonóides, que possuem atividade antioxidante e habilidade de modular várias enzimas e receptores celulares [20].

Os dados obtidos neste estudo demonstram várias atividades funcionais da planta que afetam a estimulação ou inibição das células, o que indica a necessidade de estudos mais aprofundados, a fim de estabelecer a relevância do possível efeito inibidor da linfoproliferação e da citotoxicidade do extrato aquoso de *B. trimera* bem como, os mecanismos de seu efeito antiinflamatório e sua ação terapêutica.

Referências

1. Geetha S, Sai Ram M, Singh V, Ilavazhagan G, Sawhney RC. 2002. Antioxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*)-and in vitro study. *J Ethnopharmacology* **79**: 373-378.
2. Corrêa MP. 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, (1st edn). Imprensa Nacional, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro.
3. Brandão Torres LM, Gamberini MT, Roque NF, Lima-Landman MT, Souccar C, Lapa AJ. 2000. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry* **55**: 617-619.
4. Torres MB, Gamberini MT, Roque NF, *et al* Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*. 2000; **55**: 617-619
5. De Las Heras B, Slowing K, Benedi J, *et al*. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *J Ethnopharmacology*. 1998; **61**:161-166.
6. Soicke H, Leng-Peschlow A, Characterisation of Flavonoids from *Baccharis trimera* and their Antihepatotoxic Properties. *Planta Medica* 1987: 37-39.
7. Gené RM, Marin E, Adzet T. 1992. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. *Planta Med* **58**: 37-39.
8. Gené RM, Cartañá C, Adzet T, Marin E, Parella T, Cañigüeral S. 1996. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. *Planta Med* **62**: 232-235.
9. Srinivasan k, Muruganandan S, Lal J, Chandra S, Tandan SK, Ravi Prakash V. 2001. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Pongamia pinnata* leaves in rats. *J ethnopharmacology* **78**: 151-157.
10. Brito FD. 1989. Pharmacological methods in the control of inflammation (1st ed). Rhone Poulenc LTD: Degenham.
11. Lo TN, Almeida AP, Braven MA. 1982. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. *J Pharmacol Exp Ther* **221**: 261-267.

12. Saleh TS, Calixto JB, Medeiros IS. 1996. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Br J Pharmacol* **118**: 811-819.
13. Souza-Fagundes EM, Gazzinelli G, Parreira GG, *et al.*. In vitro activity of labdane diterpene from *Alomia myriadenia* (Asteraceae): immunosuppression via induction of apoptosis in monocytes. *International Immunopharmacology*. 2003; **3**: 383-392.
14. Dutta RC, Peptide immunomodulators versus infection; an analysis. *Immunology Letters*. 2002, **0**: 1-9.
15. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; **65**: 55-63
16. Suffredini AF, Fantuzzi G, Badolato R, Oppenheim JJ, O`Grady NP. 1999. New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol* **19**: 203-214.
17. Cuzzocrea S, Mazzon E, Sautebin L, Dugo L, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP. 2002. Protective effects of Celecoxib on lung injury and red blood cells modification induced by carragenan in the rat **63**: 785-795.
18. Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *J. Ethnopharmacology*. 2000; **72**: 167-172.
19. Mongelli E, Desmarchelier C, Rodrigues TJ, *et al.* In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. *J. Ethnopharmacology*. 1997; **58**: 157-163.
20. Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*. 2002; **139**: 1-21.

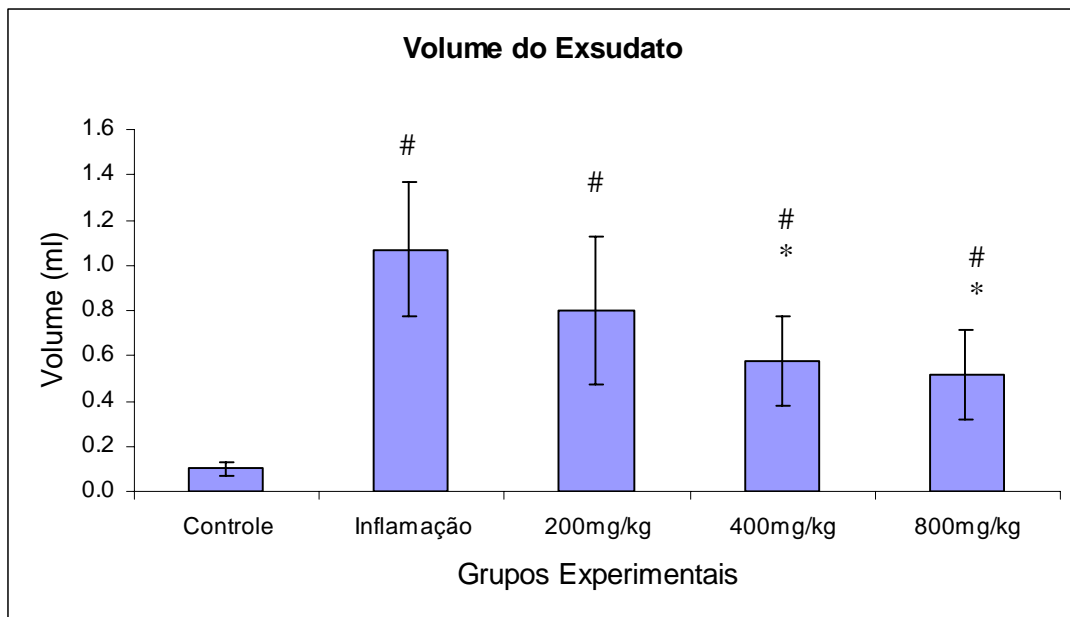


Fig. 1: Efeitos de *B. trimera* no volume de exsudato na pleurisia induzida por Carragenina em ratos. Detalhes do experimento estão descritos em Materiais e Métodos. Valores são expressos em média \pm DP. O asterisco indica diminuição significativa do volume quando comparado ao grupo Inflamação. O símbolo # indica valores elevados, se comparado com o grupo controle ($p < 0.05$).

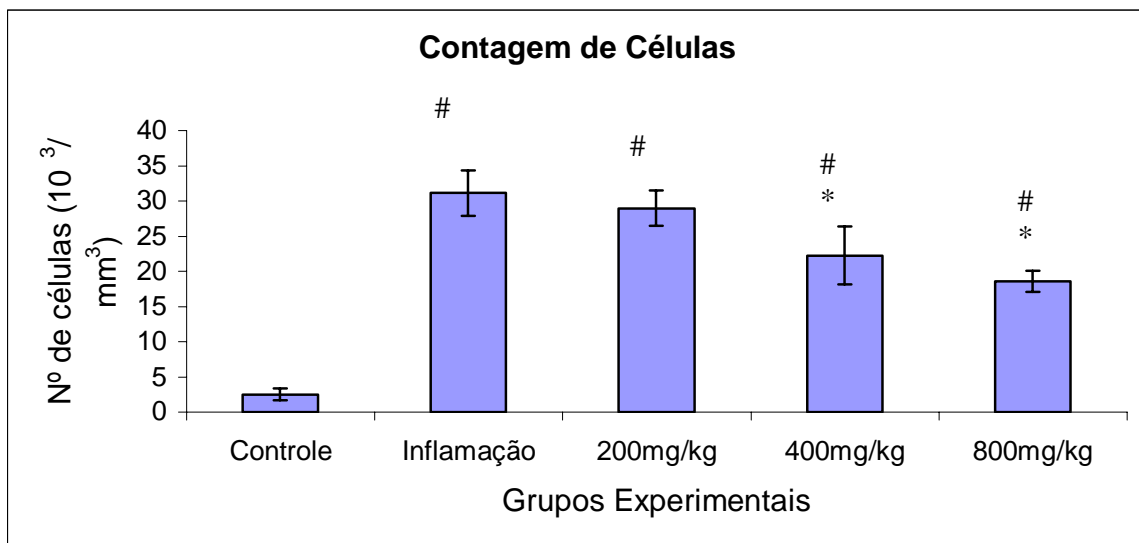


Fig. 2 Efeitos de *B. trimera* no número total de células no exsudato na pleurisia induzida por Carragenina em ratos. Detalhes do experimento estão descritos em Materiais e Métodos. Valores são expressos em média \pm DP. O asterisco indica diminuição significativa do número de células quando comparado ao grupo Inflamação. O símbolo # indica valores elevados, se comparado com o grupo controle ($p < 0.05$).

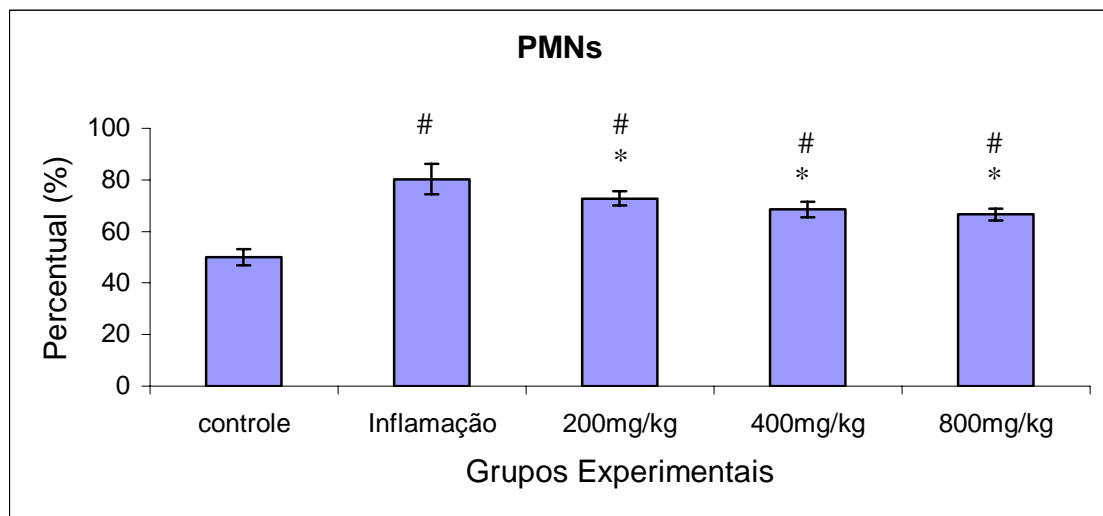


Fig. 3: Efeitos de *B. trimera* na percentagem de PMNs no exsudato na pleurisia induzida por Carragenina em ratos. Detalhes do experimento estão descritos em Materiais e Métodos. Valores são expressos em média \pm DP. O asterisco indica diminuição significativa da percentagem de PMNs quando comparada ao grupo Inflamação. O símbolo # indica valores elevados, se comparado com o grupo controle ($p < 0.05$).

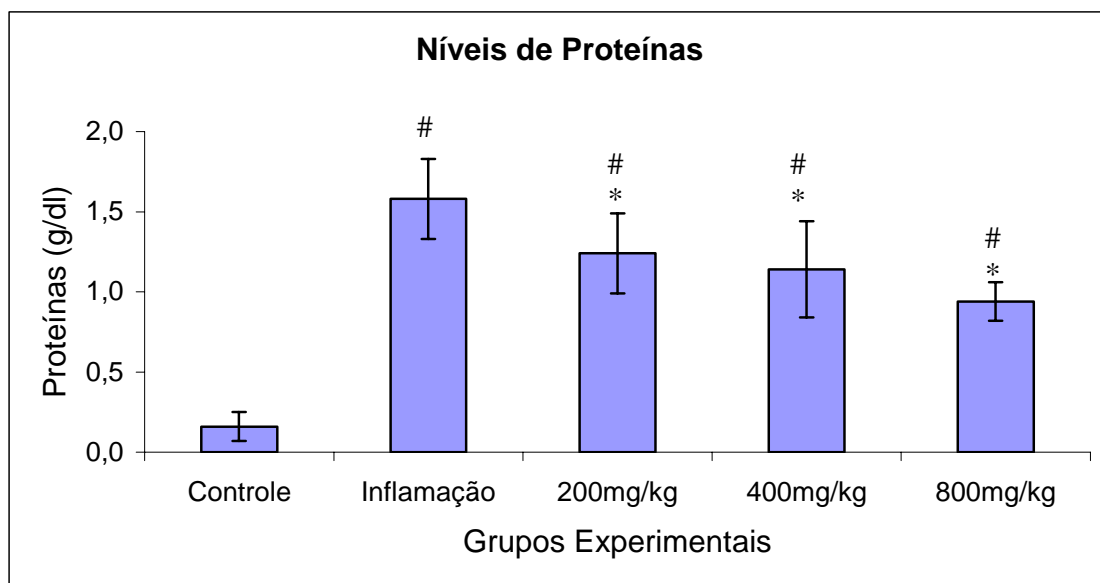


Fig. 4: Efeitos de *B. trimera* no nível de proteínas no exsudato na pleurisia induzida por Carragenina em ratos. Detalhes do experimento estão descritos em Materiais e Métodos. Valores são expressos em média \pm DP. O asterisco indica diminuição significativa dos níveis de proteínas quando comparados ao grupo Inflamação. O símbolo # indica valores elevados, se comparado com o grupo controle ($p < 0,05$).

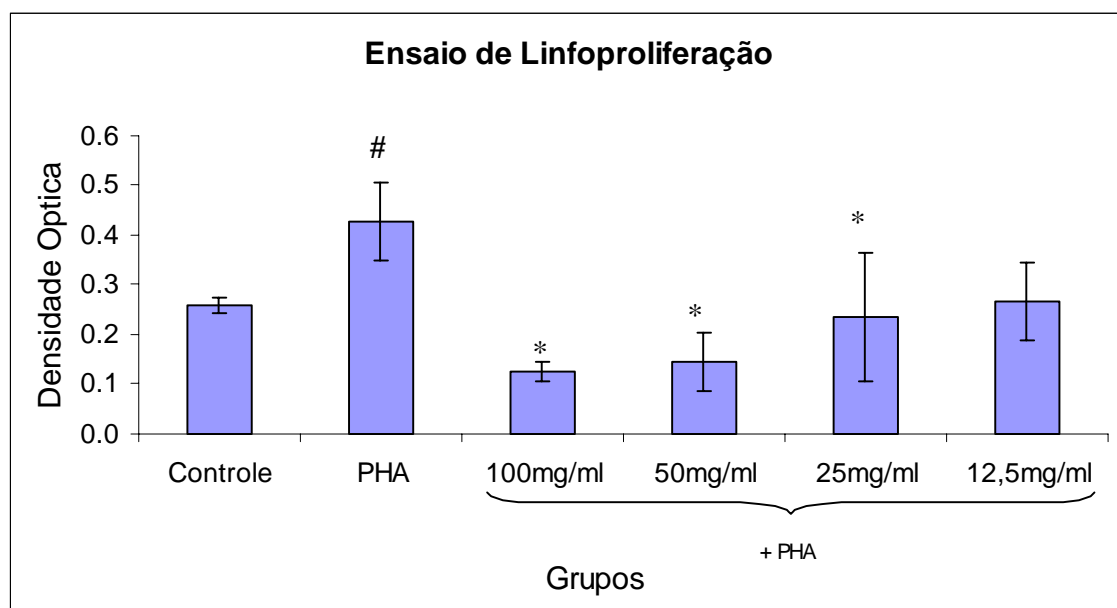


Fig. 5 Efeito imunomodulador de *B. trimera* na linfoproliferação estimulada por PHA *in vitro*. Resultados estão expressos em média de densidade óptica \pm DP. Concentrações entre 100mg/ml até 25 mg/ml mostram diminuição significativa da linfoproliferação, se comparada ao controle estimulado, indicada pelo asterisco. ($p < 0.05$). O símbolo # indica a diferença significativa entre o grupo PHA e grupo controle ($p < 0.05$).

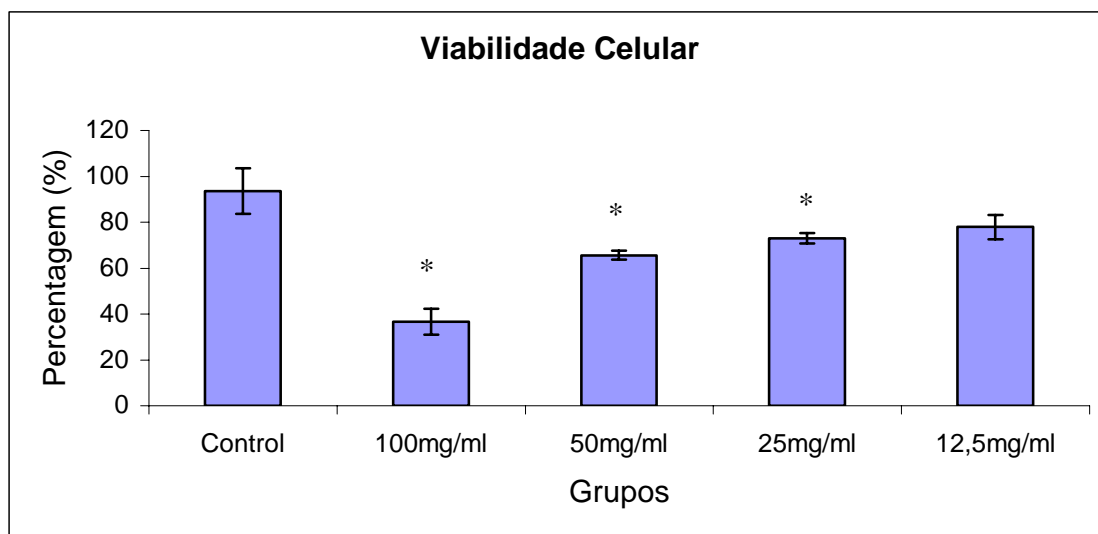


Fig.6 Efeito de *B. trimera* na viabilidade celular, *in vitro*. Resultados estão expressos em percentual médio de células viáveis \pm DP. Concentrações de 100, 50 e 25 mg/ml mostram redução significativa na viabilidade celular, quando comparada com o grupo controle, indicada pelo asterisco ($p < 0.05$).

Conclusões

Com o presente estudo podemos concluir que:

O extrato aquoso de *Baccharis trimera*, nas concentrações de 400 e 800mg/Kg de peso de rato, reduz os níveis séricos das enzimas hepáticas, no modelo experimental de lesão hepática induzida pela tioacetamida, apresentando efeito hepato protetor. Este efeito não foi detectado através de análise histológica.

O extrato aquoso de *Baccharis trimera* reduz parâmetros inflamatórios como volume de exsudato, número total de células, percentual de leucócitos polimorfonucleares e níveis de proteínas, na pleurisia induzida por Carragenina em ratos demonstrando possuir efeito antiinflamatório.

O extrato aquoso de *Baccharis trimera*, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/ml reduz significativamente a linfoproliferação estimulada pela fitohemaglutinina. Esta redução é devida à morte celular, evidenciando uma ação citotóxica da planta, o que mostra a necessidade de mais pesquisas neste campo, motivando estudos da ação do extrato frente a outras células.