

Atividade imunomoduladora da *Baccharis trimera* frente a doença cardiovascular e diabetes

***Baccharis trimera* Immunomodulatory Activity against Cardiovascular Disease and Diabetes**

DOI:10.34117/bjdv6n12-350

Recebimento dos originais:09/11/2020

Aceitação para publicação:15/12/2020

Mariane Pavani Gumy

Mestre em Plantas Medicinais e Fitoterápicos na Atenção Básica - UNIPAR

Instituição: Prefeitura Municipal de Francisco Beltrão/PR

Endereço: Rua Octaviano Teixeira dos Santos, 1.000 CEP 85.601-030

Francisco Beltrão/PR

E-mail: marianegumy@msn.com

Vaneza Paula Poplawski Carneiro

Mestre em Plantas Medicinais e Fitoterápicos na Atenção Básica - UNIPAR

Instituição: Prefeitura Municipal de Francisco Beltrão/PR

Endereço: Rua Octaviano Teixeira dos Santos, 1.000 CEP 85.601-030

Francisco Beltrão/PR

E-mail: vanezappcarneiro@gmail.com

Gustavo Ratti da Silva

Biomédico - UNIPAR

Instituição: Universidade Paranaense - UNIPAR

Endereço: Praça Mascarenhas de Moraes, 4.282 CEP: 87.502-210 Umuarama/PR

E-mail: gustavoratti@gmail.com

Diego Lacir Froehlich

Mestre em Ciência Animal (Patologia) pela Universidade do Estado de Santa Catarina

Instituição: Clínica Veterinária Dr. João

Endereço: Av. Barão do Rio Branco, 202 - Bairro São Cristóvão, Cascavel - PR

E-mail: diego.patovet@hotmail.com

Francislaine Aparecida dos Reis Lívero

Doutora em Farmacologia - UFPR

Instituição: Universidade Paranaense - UNIPAR

Endereço: Praça Mascarenhas de Moraes, 4.282 CEP: 87.502-210 Umuarama/PR

E-mail: francislaine@prof.unipar.br

Leonardo Garcia Velasquez

Doutor em Ciências - USP

Instituição: Universidade Paranaense - UNIPAR

Endereço: Praça Mascarenhas de Moraes, 4282 CEP: 87.502-210 Umuarama/PR

E-mail: leo@prof.unipar.br

RESUMO

Este estudo avaliou a atividade imunomoduladora da *Baccharis trimera* em amostras de soro, sangue total e baço de ratos Wistar submetidos a um modelo de doença cardiovascular e diabetes induzidos, analisando a concentração de citocinas e anticorpos, o perfil hematológico, o peso e a histopatologia do baço dos animais tratados com diferentes doses de fração solúvel da *B. trimera* em etanol. Após a indução do diabetes, do tabagismo e da dislipidemia, os animais foram divididos em diferentes grupos, tratados com fração solúvel de carqueja em etanol nas doses de 30 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹ e 300 mg kg⁻¹. Não houve mudanças significativas no hemograma, nem nas concentrações de IgG total, IgG1 e INF- γ . O peso do baço nos animais do grupo Controle negativo estava aumentado, sugerindo inflamação. As concentrações de IL-4 não foram detectadas pela técnica utilizada. O TGF- β mostrou-se numericamente superior nos grupos que receberam a carqueja, sugerindo ação da via Th17. Na análise microscópica do baço, o aumento dos macrófagos reforçou a idéia de que estavam relacionados com o processo de reorganização tecidual do processo inflamatório. Os dados sugerem que a carqueja modula a resposta imunológica dos animais diabetizados e submetidos a tabagismo e a dislipidemia.

Palavras-chave: *Baccharis trimera*, Imunomodulação, Tabagismo, Dislipidemia, Carqueja, Ratos Wistar.

ABSTRACT

This study evaluated the immunomodulatory activity of *Baccharis trimera* in serum, whole blood and spleen samples from Wistar rats submitted to a model of induced cardiovascular disease and diabetes, analyzing the concentration of cytokines and antibodies, the hematological profile, the weight and histopathology of the spleen of animals treated with different doses of soluble fraction of *B. trimera* in ethanol. After the induction of diabetes, smoking and dyslipidemia, the animals were divided into different groups, treated with soluble fraction of carqueja in ethanol at doses of 30 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹ and 300 mg kg⁻¹. There were no significant changes in the CBC, nor in the concentrations of total IgG, IgG1 and INF- γ . The weight of the spleen in the animals of the negative Control group was increased, suggesting inflammation. The IL-4 concentrations were not detected by the technique used. The TGF- β was numerically superior in the groups that received the carqueja, suggesting action of the Th17 route. In the microscopic analysis of the spleen, the increase of macrophages reinforced the idea that they were related to the process of tissue reorganization of the inflammatory process. The data suggest that carqueja modulates the immune response of diabetized animals submitted to smoking and dyslipidemia.

Keywords: *Baccharis trimera*, Immunomodulation, Smoking, Dyslipidemia, Carqueja, Wistar rats.

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais está relacionado com a própria evolução humana. Com o desenvolvimento de substâncias sintéticas, com funções terapêuticas, pela indústria farmacêutica no século XX, a fitoterapia nas comunidades urbanas diminuiu drasticamente (BRUNING *et al.*, 2012). Porém, inúmeros problemas começaram a surgir em decorrência do emprego maciço destas drogas, como por exemplo, as reações adversas, fazendo com que a busca por produtos naturais fosse retomada. Atualmente, com o advento das questões ambientais, levantaram-se inúmeros questionamentos sobre

a importância da flora ao homem e sua implicação na saúde e observa-se uma preocupação com o resgate da utilização da fitoterapia (ROCHA *et al.*, 2015).

O conhecimento das propriedades curativas das plantas deixou de ser considerado apenas uma tradição repassada de geração a geração (BOBEK, 2015) e tornou-se uma ciência que tem sido estudada, aperfeiçoada e aplicada por diversos povos ao longo dos anos, com embasamento científico, comprovado através da realização de ensaios pré-clínicos e clínicos que confirmam as propriedades terapêuticas das plantas potencialmente medicinais (TOMAZZONI *et al.*, 2006). O conhecimento sobre as plantas adquirido através do senso comum é influenciado pela diversidade cultural da comunidade envolvida, que o explora conforme suas necessidades de sobrevivência (SCHEK, 2011).

A busca por compostos naturais que sejam úteis ao tratamento de doenças, sejam elas infecciosas ou não, como por exemplo as de origem autoimune, é imprescindível. Para tanto, se fazem necessários estudos que compreendam a relação destes compostos com o sistema imune para estabelecer a atividade imunomoduladora (SEYFRIED *et al.*, 2016).

Assim, abre-se a discussão sobre a possibilidade de compostos bioativos das plantas não agirem diretamente no micro-organismo, mas no sistema imune do hospedeiro, colaborando assim com o seu funcionamento. Tal fato pode ser justificado pelo emprego de compostos oriundos de plantas medicinais para o tratamento de doenças de origem autoimune (MOUTIA *et al.*, 2016; MBIANTCHA *et al.*, 2017; VAN VUUREN E HOLL, 2017). Dessa forma, a pesquisa por compostos bioativos que ajam diretamente no sistema imunológico, modulando seu funcionamento, pode ser a chave da resposta para o encontro de terapias alternativas que tragam melhoria na qualidade de vida de milhares de pessoas.

Baccharis trimera (Less.) DC., pertencente à família Asteraceae, popularmente conhecida como carqueja, é uma espécie vegetal nativa da América do Sul, cultivada principalmente no Brasil, Chile, Argentina, Paraguai e Uruguai (RUIZ *et al.*, 2008). No Brasil é encontrada nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BARROSO; BUENO, 2002). Trata-se de um subarbusto perene, ereto, muito ramificado na base, com expansões triangulares achatadas (cladódios) e que atinge de 50-80 centímetros de altura (LORENZI; MATOS, 2002). Exibe inflorescências tipo capítulos, unissexuais, dispostas ao longo dos ramos, de cor branco-amareladas (JACOMASSI *et al.*, 2017). É uma planta rústica e de fácil cultivo (BUDEL *et al.*, 2009). Refere-se a uma espécie com amplo uso tradicional e devido a sua importância para a medicina popular no Brasil, a *B. trimera* foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), como parte da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da

Saúde e sua monografia consta na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). É uma planta cujo uso popular tem sido atribuído às ações gastroprotetora, hepatoprotetora, anti-inflamatória, hipoglicemiante, antioxidante e para o tratamento da febre reumática (reumatismo), sendo esta última uma doença de origem autoimune (FERREIRA, 2012). Trata-se de uma espécie promissora para o tratamento das doenças cardiovasculares (DCV) também. Souza *et al.* (2019) descreveram os efeitos cardioprotetores da *B. trimera* em um modelo com múltiplos fatores de risco associados (diabetes, tabagismo e dislipidemia) em ratos Wistar, machos, utilizando doses de 30 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹ e 300 mg kg⁻¹ da fração solúvel de carqueja em etanol por gavagem durante duas semanas.

As atividades biológicas e farmacológicas relatadas da *B. trimera* foram estudadas principalmente em partes aéreas da planta, sendo que a composição química da carqueja varia de acordo com a parte utilizada da planta, ou seja, região-seletiva, sendo os flavonóides os metabólitos secundários encontrados em maior concentração e os que apresentam maior atividade terapêutica. Estudos químicos revelaram a presença de flavonóides (como quercetina, luteolina, nepetina, apigenina, rutina, kaempferol e hispidulina), taninos, saponinas, lactonas diterpênicas, além de óleo essencial com α -pineno, β -pineno, carquejol, acetato de carquejila, canfeno e limoneno (KARAM *et al.*, 2013).

A carqueja possui baixa toxicidade por via oral, porém foi observada uma moderada toxicidade por via intraperitoneal em estudo com a administração do extrato em ratas. A aplicação teve efeito abortivo, sendo contra-indicada durante a gestação e a lactação (PERON *et al.*, 2008). Em pacientes hipertensos em tratamento com anti-hipertensivos pode-se verificar sinergismo, com elevação do efeito do medicamento, aconselhando-se o ajuste das doses (KARAM *et al.*, 2013).

Segundo as Diretrizes de Cardiologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia (PRECOMA *et al.*, 2019), doenças cardiovasculares (DCV) afetam o coração e os vasos sanguíneos e são consideradas como a principal causa de morte no Brasil e no mundo. Embora as taxas de mortalidade estejam diminuindo no Brasil, provavelmente como resultado de políticas de saúde bem-sucedidas, o número total destas está aumentando principalmente devido ao envelhecimento e adoecimento da população. Além de fatores sócio-demográfico, étnicos, culturais, dietéticos e comportamentais, fatores de risco clássicos como hipertensão, dislipidemia, obesidade, sedentarismo, tabagismo, diabetes e histórico familiar aumentam a incidência de DCV (PRECOMA *et al.*, 2019).

A aterosclerose é uma DCV caracterizada pela inflamação crônica da parede da artéria e formação de placas. O processo inflamatório promove elevação dos níveis de citocinas, o que está diretamente relacionado a recrutamento de monócitos e infiltração de macrófagos na parede arterial, com formação da placa (BARBALHO *et al.*, 2015). A ativação de diferentes células do sistema imune

está envolvida diretamente na gênese do depósito das substâncias constituintes destas placas (BARBALHO *et al.*, 2015). Um dos fatores desencadeantes da aterosclerose, a hiperglicemia, junto com o desenvolvimento do diabetes *mellitus* (DM), está relacionada ao desenvolvimento da aterosclerose por diferentes mecanismos (BARBALHO *et al.*, 2015). O diabetes *mellitus* é uma desordem metabólica de múltipla etiologia, caracterizado por hiperglicemia crônica decorrente de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Trata-se de uma doença autoimune, consequência da destruição gradual das células beta pancreáticas, com participação de anticorpos e/ou linfócitos autorreativos, resultando em anormalidades metabólicas (SOUZA *et al.*, 2016). Dislipidemia é a elevação de colesterol e triglicerídeos no plasma ou a diminuição dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) que contribuem para a aterosclerose (GONDIM *et al.*, 2017). O tabagismo é reconhecido como uma doença crônica causada pela dependência à nicotina presente nos produtos à base de tabaco. O tabagismo desempenha processos patológicos significativos, como lesão endotelial e consequente desequilíbrio morfofuncional, responsável pela fisiologia do tônus vascular e hemostasia, exposição de proteínas adesivas de superfície, perda do sinal antitrombótico, causados pelas toxinas do cigarro, aumentando o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SANTOS *et al.*, 2017).

Segundo Andrade e colaboradores (2016), o sistema imunológico é um complexo e sofisticado sistema de defesa, constituído por uma rede de células e moléculas dispersas por todo organismo, capaz de reconhecer estruturas estranhas (antígenos) e desenvolver uma resposta efetora diante da ameaça, provocando a sua destruição ou inativação, com a finalidade de manter a homeostasia do organismo.

Conforme pode-se observar, o balanço na produção das citocinas dita o comportamento do sistema imune frente a determinado problema, sendo elas fundamentais ao bom funcionamento do sistema imunológico. Assim, a quantificação de citocinas, anticorpos e a análise das populações celulares no interior dos tecidos linfóides secundários fornecem informações importantes na avaliação da atividade imunomoduladora de plantas medicinais.

As plantas medicinais têm grande potencial na modulação do sistema imunológico, modificando as respostas imunológicas através de agentes anti-inflamatórios, anti-infecciosos, entre outros. Seus constituintes ativos são considerados recursos promissores contra várias doenças (NUNES PINHEIRO, 2003), no entanto, estudos pré-clínicos e clínicos comprovando seu mecanismo de ação como imunomoduladores e seus efeitos adversos são extremamente necessários. Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar atividade imunomoduladora da *B. trimera* associada a fatores de risco que desencadeiam doenças cardiovasculares em ratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PREPARO DO EXTRATO

As partes aéreas de *B. trimera* foram coletadas em fevereiro de 2018 no Herbário do Horto Medicinal da Universidade Paranaense (UNIPAR), localizado a 430 metros acima do nível do mar (S 23°46'11.3" – W 53°16'41.2") em Umuarama-PR. Um exemplar da espécie (número 07) foi depositado no Herbário. As partes aéreas coletadas foram secadas em fluxo de ar forçado $\pm 45^{\circ}\text{C}$, trituradas, adicionada água filtrada fervida para infusão (infuso) e após a infusão foi adicionado etanol para precipitação das proteínas. Após, foi retirado o etanol, rotaevaporado a $\pm 45\text{-}50^{\circ}\text{C}$, finalizando a sua liofilização. O precipitado do infuso foi o produto final. A fração solúvel de *B. trimera* em etanol foi preparada no Laboratório de Pesquisa Pré-Clínica de Produtos Naturais da UNIPAR em Umuarama-PR, de acordo com métodos previamente descritos por Souza e colaboradores (2019). O rendimento foi de 16,88%.

2.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

O modelo de diabetes e dislipidemia associados ao tabagismo foi desenvolvido em ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), machos, pesando entre 200 e 250g, obtidos da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais foram alojados no biotério do Laboratório de Pesquisa Pré-Clínica de Produtos Naturais da Universidade Paranaense (UNIPAR) em Umuarama-PR, com livre acesso a dietas líquida e sólida e em condições ambientais controladas (temperatura: $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$; umidade relativa: $50 \pm 10\%$; ciclo claro/escuro: 12 horas). Todo o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA) da UNIPAR (protocolo número 1000/2018) e foram respeitadas todas as normativas e recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), visando o bem-estar e a redução do número de animais em experimentação. O estudo foi conduzido e descrito de acordo com as orientações de Animal Research: Reporting of *in vivo* Experiments (ARRIVE) Guidelines.

2.3 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS

Para indução do diabetes, após jejum prévio de 12 horas, os animais do grupo diabético receberam, por via intraperitoneal, 60mg kg^{-1} de estreptozotocina (STZ) diluída em tampão citrato (10mM, pH 4,5). Os animais do grupo normoglicêmico receberam apenas veículo (tampão citrato) nas mesmas condições dos animais que foram diabetizados. Seguindo-se à injeção, os ratos foram mantidos em jejum adicional de 1 hora, a fim de evitar a competição da droga com as moléculas de glicose provenientes da dieta. Três dias após a aplicação de STZ, a glicemia foi aferida por meio do

glicosímetro AccuCheck Active (Roche®), coletando-se pequeno volume de sangue periférico da cauda em fitas reativas. Todos os ratos ficaram diabéticos e foram mantidos. Ao fim dos experimentos, uma nova aferição da glicemia foi realizada para confirmação do estado diabético.

2.4 INDUÇÃO DA DISLIPIDEMIA

Para a indução da dislipidemia, os animais diabéticos receberam dieta padrão comercial (Purina®) enriquecida com 0,5% de colesterol (5kg de ração padrão para roedores triturada, 116 gemas de ovos de galinha e 43ml de óleo de milho). Em seguida, todos os ingredientes foram misturados com água e secos em estufa a 50°C por 36 horas e acondicionadas em sacos a vácuo. Os animais receberam essa dieta *ad libitum* durante quatro semanas.

2.5 EXPOSIÇÃO AO APARATO DE CIGARRO

A exposição à fumaça do cigarro ocorreu concomitantemente com a indução da dislipidemia. Os animais foram submetidos a uma exposição de nove cigarros comerciais, uma hora por dia, uma vez ao dia, cinco dias por semana, por um período de quatro semanas, conforme proposto por Souza e colaboradores (2019). Os animais do grupo controle basal foram submetidos às mesmas condições da caixa, entretanto, sem nenhum contato com a fumaça do cigarro, inalando apenas ar filtrado. O aparato para exposição à fumaça do cigarro em que os animais foram acondicionados consiste em um sistema de captação e distribuição de cigarro. A fumaça é lançada verticalmente de cima para baixo, alcançando os animais e difundindo-se por toda caixa.

2.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Nas duas últimas semanas experimentais, os animais foram randomizados e tratados com veículo e diferentes doses de fração solúvel de carqueja em etanol (CQ30, 100 e 300 mg kg⁻¹), por via oral, através de gavagem. As drogas foram preparadas imediatamente antes da administração. Assim, os grupos experimentais foram:

- 1) Controle basal: animais normoglicêmicos (n = 8), sem exposição à fumaça de cigarro, que receberam dieta comercial padrão.
- 2) Controle negativo: animais diabéticos (n = 8), expostos à fumaça de cigarro, que receberam dieta comercial padrão acrescida de 0,5% de colesterol.
- 3) CQ 30: animais diabéticos (n = 8), expostos à fumaça de cigarro, que receberam dieta comercial padrão acrescida de 0,5% de colesterol.

4) CQ 100: animais diabéticos (n = 8), expostos à fumaça de cigarro, que receberam dieta comercial padrão acrescida de 0,5% de colesterol.

5) CQ 300: animais diabéticos (n = 8), expostos à fumaça de cigarro, que receberam dieta comercial padrão acrescida de 0,5% de colesterol.

Ao término das quatro semanas experimentais, os ratos foram submetidos a uma nova coleta de sangue e, na sequência, sofreram eutanásia por aprofundamento anestésico com isoflurano em câmara de saturação (1-3%), seguido de deslocamento cervical, de acordo com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA.

2.7 PESO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO BAÇO

Após eutanásia, foi realizada laparotomia para coleta do baço. O órgão foi pesado em balança analítica e seccionado para histopatologia. Um fragmento foi acondicionado em formalina tamponada e posteriormente confeccionada lâmina que foi corada com hematoxilina e eosina. Ao microscópio óptico, foram avaliadas regiões específicas (polpa vermelha e polpa branca).

2.8 HEMOGRAMA

Foram coletadas amostras de sangue total em tubos com EDTA no momento da eutanásia para realização de hemograma, os quais foram realizados pelo Laboratório de Análises Clínicas da UNIPAR em Umuarama-PR.

2.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

Foram coletadas amostras de sangue total em tubos no momento da eutanásia. Após, os tubos foram depositados em uma centrífuga e o soro de cada animal foi transferido para *ependorfs* identificados para a avaliação da atividade imunomoduladora por ELISA, realizada no Laboratório de Hematologia da UNIPAR em Francisco Beltrão-PR, dos seguintes marcadores imunológicos:

IL-4: kit RAt IL-4 ELISA BMS355442 da MyBioSource, seguindo as recomendações da bula do kit;

INF- γ : kit Rat INF gamma Platinum ELISA BMS621 / BMS621TWO / BMS621TEN da eBioscience, seguindo as recomendações da bula do kit;

TGF- β : kit Rat TGF beta 1 Platinum ELISA BMS623/3 / BMS623/3TEN da eBioscience, seguindo as recomendações da bula do kit;

IGg1: kit Rat IgG1 Ready-Set-Go! 88-50500 da eBioscience, seguindo as recomendações da bula do kit;

IgG total: kit RatIgG Total Uncoated ELISA 88-50490-22 da ThermoFischerScientific, seguindo as recomendações da bula do kit.

2.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism 8.0. Os ensaios foram submetidos ao método de Anova com pós-teste de Tukey. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,00001.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 1 e 2 abaixo trazem informações sobre o hemograma realizado em cada um dos grupos experimentais.

Figura 1: Perfil celular e de hemoglobina obtidos no hemograma. A: Número de hemácias em cada um dos grupos experimentais; B: Concentração de hemoglobina em cada um dos grupos experimentais; C: Número de leucócitos totais em cada um dos grupos experimentais; D: Número de plaquetas em cada um dos grupos experimentais. Análise estatística realizada pelo método de Anova com pós-teste de Tukey.

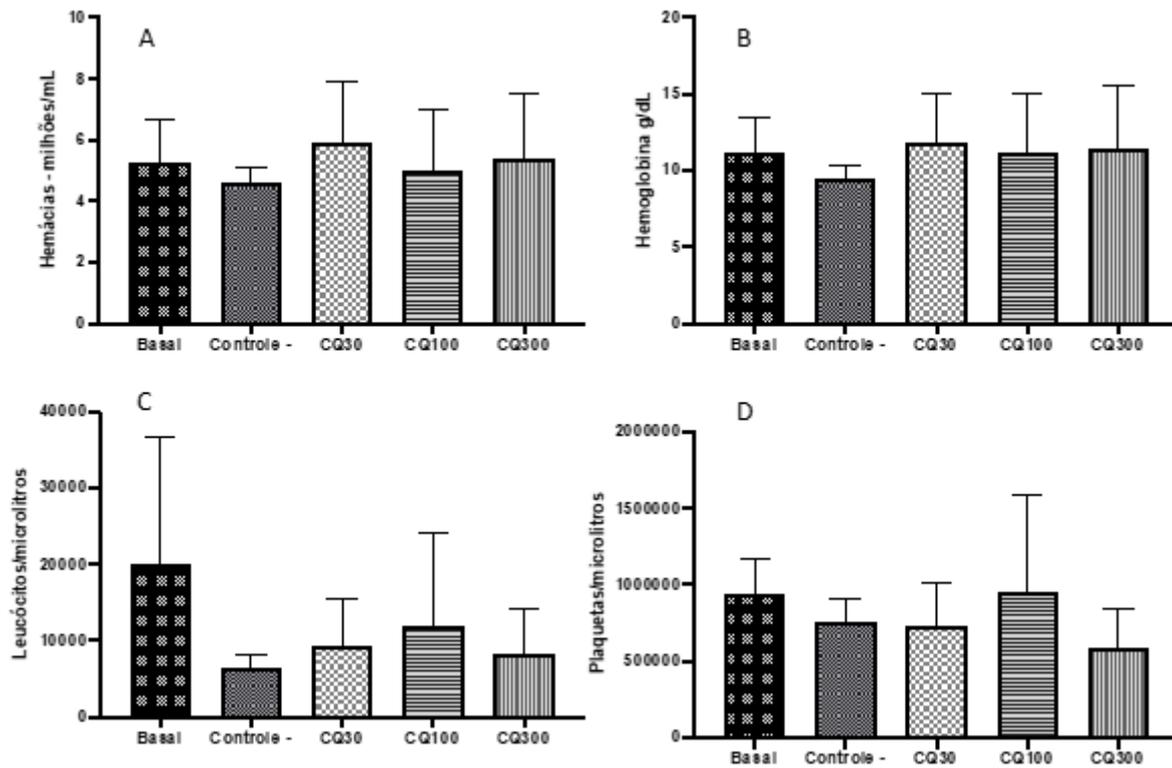
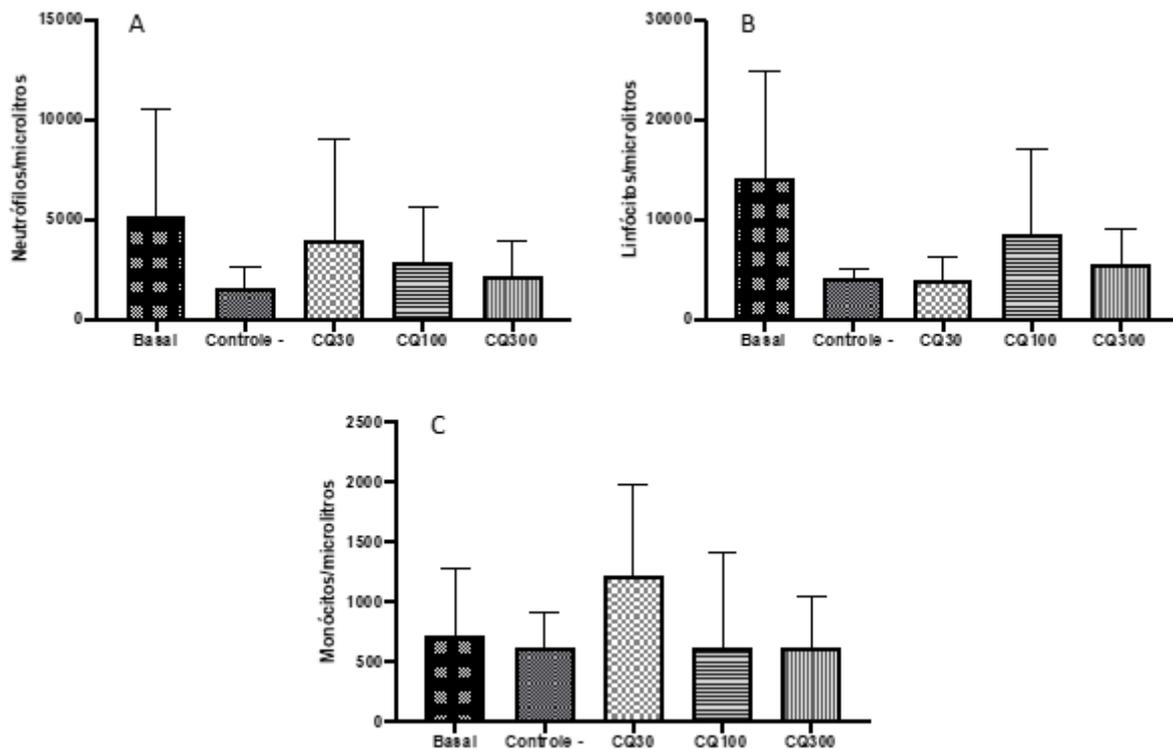


Figura 2: Análise diferencial do leucograma obtido no hemograma. A: Número de neutrófilos em cada um dos grupos experimentais; B: Número de linfócitos em cada um dos grupos experimentais; C: Número de monócitos em cada um dos grupos experimentais. Análise estatística realizada pelo método de Anova com pós-teste de Tukey.



Observou-se que o tratamento com a *B. trimera* nas três diferentes doses não alteraram significativamente o hemograma. A concentração de hemoglobina mostrou-se numericamente superior ao controle negativo (C-) (concentração média de 9,45 mg/dL para o C- e 11,82 g/dL, 11,16 g/dL e 11,42 g/dL respectivamente para os grupos tratados) e muito semelhante ao controle basal (11,1 g/dL). Como o hemograma é um exame que analisa as células circulantes (eritrócitos ou hemácias, leucócitos e plaquetas) e no presente estudo foi induzido o diabetes através da aplicação de estreptozotocina, além do estímulo forçado à dislipidemia e tabagismo, ou seja, lesões pontuais e com tempo de agressão curto, a hipótese é de que não houve tempo hábil para que alterassem estes parâmetros hematológicos.

Foi observada ainda uma tendência numérica na diminuição do número de neutrófilos e monócitos circulantes, conforme o aumento da dose, apesar de estarem superiores ao C- (Neutrófilos: C- 1576 células/μL; CQ30 3999 células/μL; CQ100 2852 células/μL; CQ300 2163 células/μL) (Monócitos: C- 619 células/μL; CQ30 1224 células/μL; CQ100 623 células/μL; CQ300 612 células/μL). Verificou-se a tendência do número de neutrófilos e monócitos circulantes superior ao controle negativo e que diminuiu com o aumento da dose da *B. trimera*. Tal fato pode estar relacionado com diminuição na migração celular tecidual, que é inerente da atividade anti-

inflamatória descrita para a carqueja, e, conseqüentemente, diminuindo o estímulo medular na produção destas células.

Grance e colaboradores (2008) observaram que os resultados hematológicos foram semelhantes entre os grupos de trinta e cinco ratos Wistar fêmeas prenhas que receberam o extrato hidroetanólico de *B. trimera* via oral, divididas em três grupos. Os grupos 1 e 2 receberam 8,4 mg kg⁻¹ do extrato por via oral do dia gestacional (GD) 1 a 19 e de GD 6 a 15, respectivamente, enquanto os animais do grupo controle receberam água destilada por via oral de GD 1 a 19.

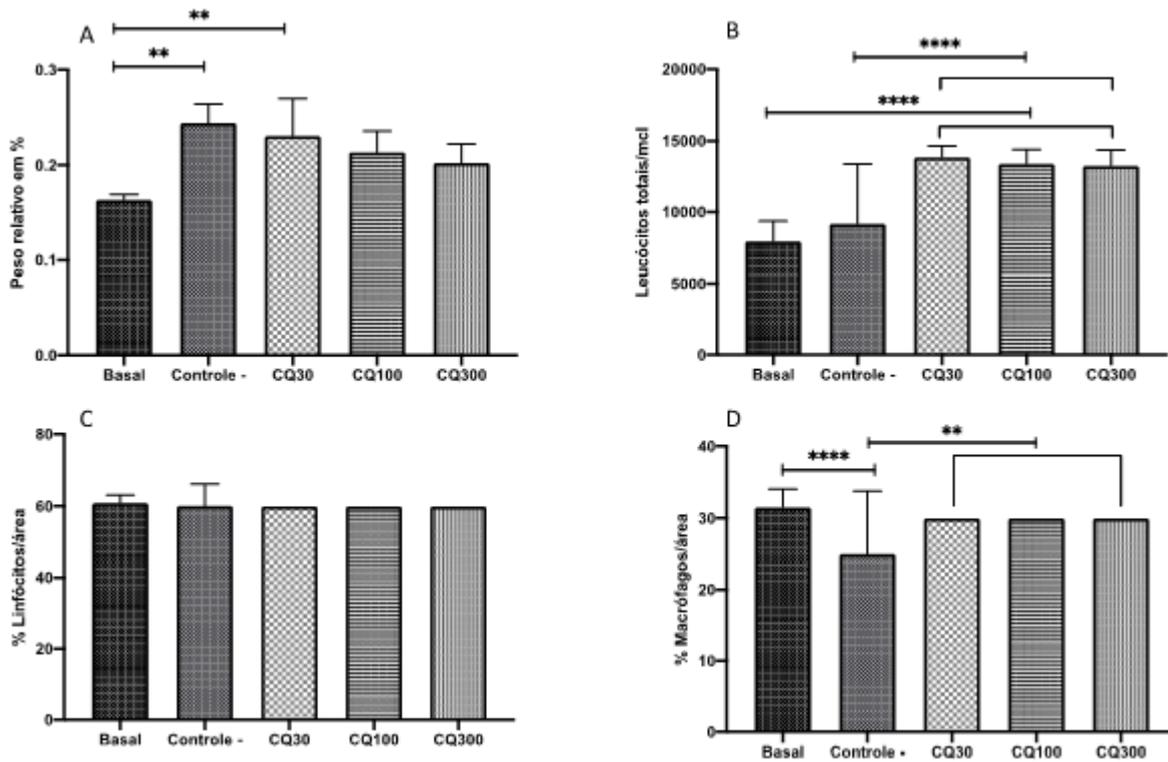
Peron e colaboradores (2008) relataram a infusão de carqueja nas concentrações de 6,85 e 68,50 mg mL⁻¹ em células de medula óssea de seis ratos Wistar, com cerca de 35 dias, sendo três machos e três fêmeas, para cada grupo controle e tratamento, tratados *in vivo*, via gavagem, em tratamento agudo. Para o controle negativo, foi administrada aos animais somente água (1 mL/100g), via gavagem e no controle positivo foi utilizada a ciclofosfamida (1,5 mg/1mL água/100g), via intraperitoneal, por 24 horas. A infusão de carqueja não demonstrou ser citotóxica nem clastogênica estatisticamente significativas em células de medula óssea, bem como Rodrigues e colaboradores (2009) descreveram que não foram observados efeitos genotóxicos sobre as células sanguíneas e hepáticas em camundongos CF-1 adultos, tratados com 0,5 g kg⁻¹, 1,0 g kg⁻¹ e 2,0 g kg⁻¹ de extrato aquoso de *B. dracunculifolia* por gavagem, durante 3 dias consecutivos.

Em outro estudo sobre toxicidade aguda com doses repetidas de extrato aquoso de carqueja em concentrações diferentes por infusão em ratos (machos e fêmeas), foi observada a ausência de alterações significativas do perfil hematológico bem como dos marcadores de funções hepática e renal (RUIZ *et al.*, 2008).

Segundo Ferreira (2012), o infuso aquoso de carqueja em modelo de artrite induzida por colágeno, teve efeito anti-artrítico comprovado, ação atribuída ao efeito imunossupressor e anti-inflamatório de flavonóides e saponinas presentes em outras plantas com a mesma atividade. Avaliando a citotoxicidade, não foi evidenciado efeito tóxico nos rins, fígado, bem como as análises bioquímicas e o perfil hematológico não sofreram alterações. Ferreira (2012) também não observou alteração estatística significativa nos parâmetros hematológicos analisados de camundongos tratados com doses de carqueja comparando-os ao seu grupo controle. Tais trabalhos corroboram os resultados encontrados no presente estudo.

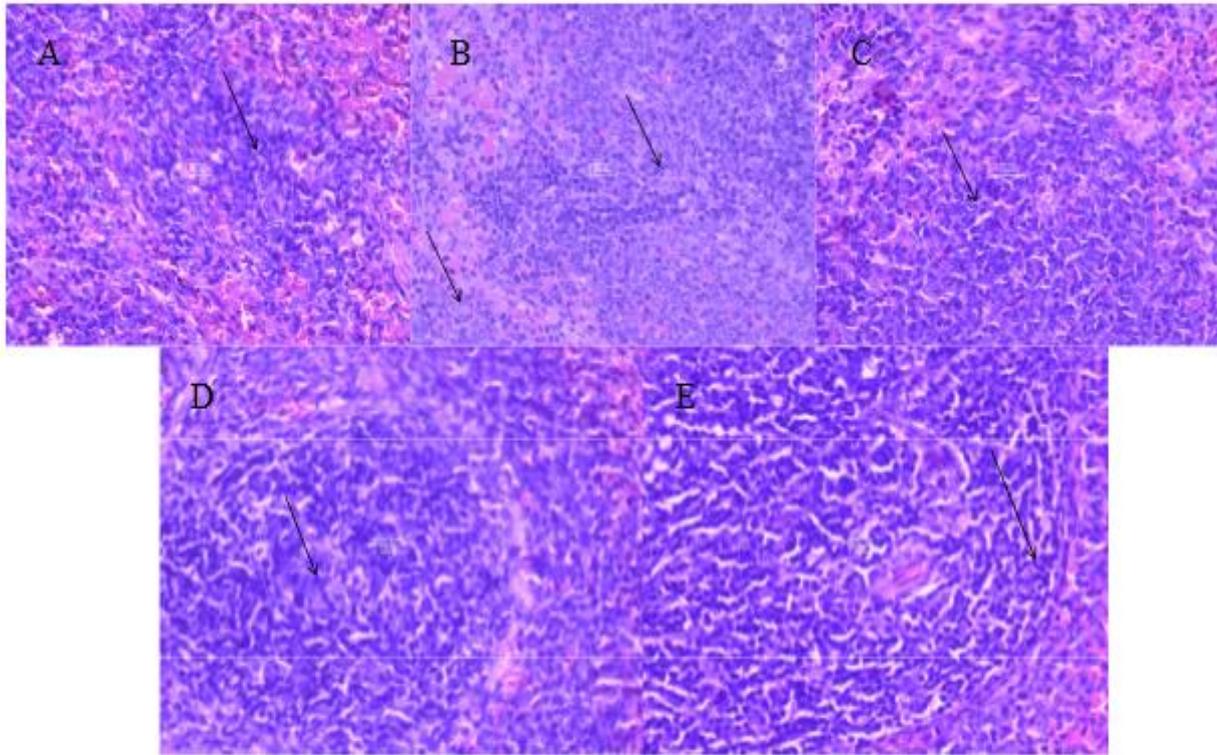
Outros parâmetros avaliados no presente trabalho foram o peso relativo e o perfil histopatológico dos baços dos animais, cujos resultados estão apresentados nas figuras 3 e 4.

Figura 3: Avaliação de peso relativo e histopatologia do baço dos animais. A: Peso relativo do baço em cada um dos grupos experimentais; B: Número de leucócitos em cada um dos grupos experimentais; C: Porcentagem de linfócitos em cada um dos grupos experimentais; D: Porcentagem de macrófagos em cada um dos grupos experimentais. Análise estatística realizada pelo método de Anova com pós-teste de Tukey.



A contagem de célula foi feita por microscopia realizada em cinco campos diferentes da lâmina do baço de cada animal.

Figura 4: Perfil histopatológico do baço dos diferentes grupos. A: Observa-se quantidade e população normal de linfócitos no centro do folículo, havendo predomínio de linfócitos; B: C-: áreas de hiperplasia linfóide, demonstrando uma população celular evidente e mitótica; C: CQ30: Hiperplasia linfóide evidente, demonstrando uma população celular mitótica; D: CQ 100: Hiperplasia linfóide acentuada e difusa; E: CQ300: Hiperplasia linfóide acentuada e multifocal moderada.



Além da avaliação do perfil celular do baço, também foi verificada a presença de edema no tecido. A análise mostrou presença de edema acentuado (+++) no grupo controle negativo com diminuição para os demais grupos experimentais.

O baço é um órgão linfóide pertencente ao sistema imune, com consistência mole, muito vascularizado e de coloração púrpura. É dividido macroscopicamente em polpa vermelha, onde ocorre a hemocaterese e polpa branca, responsável pela defesa imunológica específica contra antígenos presentes no sangue circulante (COELHO, 2011).

Observou-se que o peso relativo do baço estava aumentado no grupo controle negativo e no CQ30 em comparação ao grupo basal. Tal fato pode estar relacionado a uma resposta ao processo inflamatório desencadeado para recuperar as injúrias causadas pelo diabetes, tabagismo e dislipidemia induzidos nos animais. Uma hipótese apontada é que o aumento do volume plasmático oriundo de um possível edema tenha desencadeado o aumento do peso, com presença de componentes hemolíticos.

Não foi constatada diferença estatística entre os grupos tratados e o C- (Peso relativo C- 0,24%; CQ30 0,23%; CQ100 0,21%; CQ300 0,20%). As doses de CQ100 e CQ300 não

apresentaram diferença estatística com relação ao basal, ou seja, o peso relativo do órgão dos animais, após o tratamento, manteve-se estatisticamente do mesmo tamanho que o dos animais saudáveis, o que reforça a ideia da atividade anti-inflamatória da planta. Por outro lado, o grupo doente (C-) também não apresentou diferença estatística com relação aos grupos tratados CQ100 e CQ300, apesar destes serem percentualmente inferiores, o que sugere que doses superiores da carqueja ou um período de tempo maior de observação possam tornar mais efetiva sua capacidade de promover melhora nas alterações teciduais causadas no baço.

Nas figuras 3B, 3C e 3D estão retratados os perfis celulares do baço dos diferentes animais estudados.

Como o baço é um órgão linfóide e está relacionado ao processo inflamatório, provavelmente o sistema imunológico estava funcionando para responder às agressões sofridas como a indução do diabetes, fumaça de cigarro e a dislipidemia. Ele é altamente vascularizado e compartimentalizado, com funções imunológicas e hematológicas (SILVA, 2017). Durante a inflamação, ocorre a liberação de compostos inflamatórios, como as interleucinas (IL), espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, em elevadas concentrações, causando um desequilíbrio oxidativo (SOARES *et al.*, 2015).

A administração de *B. trimera* em CQ30, CQ100 e CQ300 conseguiu realizar a atração leucocitária para o local da inflamação, potencializando o processo de defesa do organismo. Porém, de acordo com o gráfico de análise microscópica de tecidos, não houve alteração no número de linfócitos. Por outro lado, a porcentagem de macrófagos foi superior no grupo que recebeu as três diferentes doses da carqueja, o que sugere que a planta modulou a mobilização dessas células para o interior do tecido. Assim, se o número de leucócitos aumentou, o número de linfócitos permaneceu inalterado e o número de macrófagos aumentou, sugere-se que os macrófagos tenham tido papel importante na imunomodulação ocorrida no tecido, além de terem contribuído para o aumento do mesmo. Foi observado na avaliação histopatológica que o edema causado pela inflamação, que estava presente no grupo controle, diminuiu de forma gradativa nos animais tratados. Tal fato, associado ao aumento no número de macrófagos, reforça a ideia de que a reação inflamatória tenha diminuído e o aumento de macrófagos estaria relacionado com o processo de reorganização tecidual, que é feito através da fagocitose de restos celulares e de hemoglobina, já que o baço é um órgão com importante função de controle de hemácias na corrente sanguínea.

O processo inflamatório é uma resposta do organismo frente a uma infecção ou a uma injúria tecidual e é composto por uma resposta inata (inespecífica), responsável pelas características da inflamação (vermelhidão, edema, calor, dor e perda de função) e uma resposta imunológica, com

produção de anticorpos específicos contra um determinado agente agressor (COUTINHO *et al.*, 2009). Durante a inflamação, as citocinas são liberadas para regular a ação dos anticorpos. Entre as citocinas pró-inflamatórias, destacam-se TNF- α (fator de necrose tumoral α) e IL-1, liberadas por macrófagos ativados. Estas citocinas favorecem a aderência leucocitária ao endotélio, aumentam a síntese de prostaciclina e desencadeiam uma cascata de citocinas secundárias (COUTINHO *et al.*, 2009).

Um dos fatores que desencadeiam o processo inflamatório é o diabetes *mellitus*, que é uma desordem metabólica de múltipla etiologia, caracterizado por hiperglicemia crônica decorrente de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Trata-se de uma doença autoimune, decorrente da destruição gradual das células beta pancreáticas, provocada por múltiplos fatores, com participação de anticorpos e/ou linfócitos autorreativos, resultando em anormalidades metabólicas (WITT *et al.*, 2011). A deficiência de insulina em consequência aos danos às células pancreáticas leva à hiperglicemia, sendo que as manifestações clínicas mais comuns são a poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva com dano ou falência de múltiplos órgãos. No desenvolvimento do DM, participam células do sistema imune, como linfócitos, macrófagos e células dendríticas, bem como componentes do sistema humoral, como auto anticorpos específicos para antígenos das ilhotas pancreáticas e as citocinas pró-inflamatórias (WITT *et al.*, 2011).

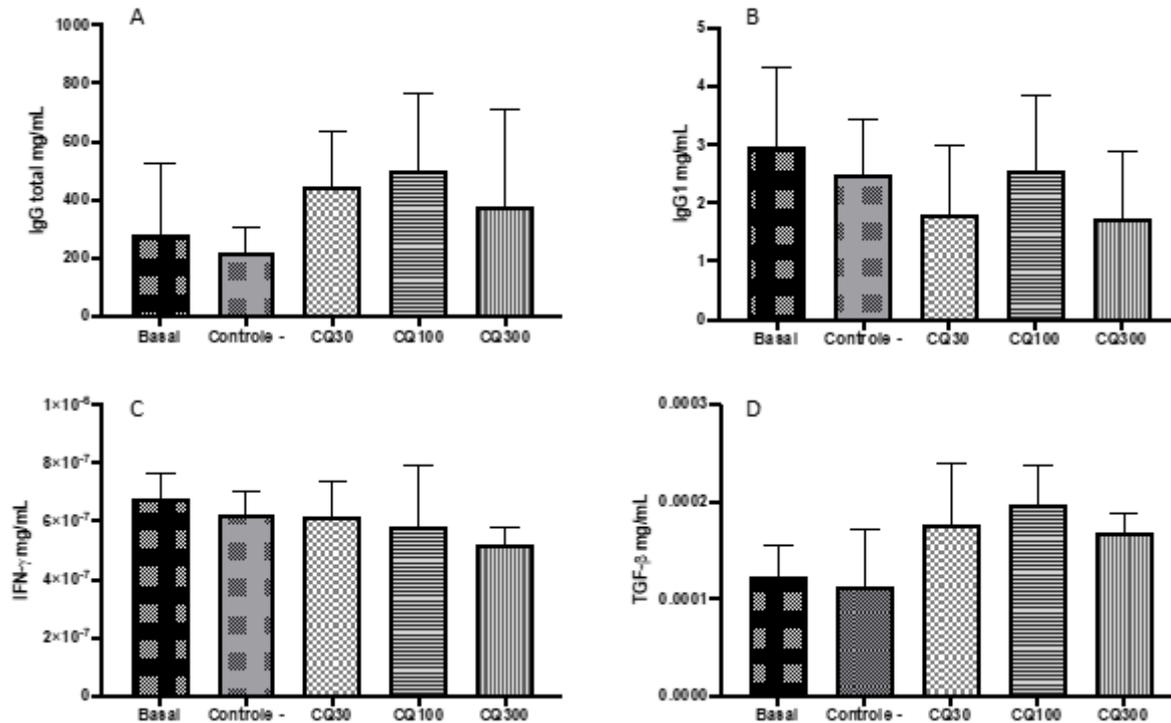
No DM tipo 1, que acomete principalmente crianças ou jovens, ocorre uma destruição crônica das células β pancreáticas, por meio de mecanismos autoimunes, mediados por células como linfócitos T e macrófagos. O processo de autodestruição se inicia muito antes do diagnóstico clínico da doença. Já no DM tipo 2, ocorre a resistência à ação da insulina, diminuindo a captação de glicose em tecidos insulina dependentes. No início da doença ocorre hiperinsulinemia compensatória, continuando por meses ou anos. Com o avanço do DM2, por causa da disfunção e redução das células β pancreáticas, a síntese e a secreção de insulina ficam comprometidas e, na maioria dos casos, a insulino terapia torna-se essencial (FERREIRA *et al.*, 2011). O presente estudo é um modelo de diabetes *mellitus* tipo 2, pela administração de estreptozotocina e indução da dislipidemia.

O aumento da glicose sérica promove a formação endógena dos produtos de glicação avançada (AGEs), responsáveis por complicações macrovasculares, incluindo danos celulares e teciduais. A hiperglicemia provoca o aumento de AGEs circulantes e dificuldade de degradação e eliminação, fazendo com que os níveis de apoproteína B plasmática aumentem. Como ela é constituinte da lipoproteína de baixa densidade (LDL), este aumento contribui para o desenvolvimento de aterosclerose por meio da deposição da LDL e da apoproteína B na parede das artérias, ocorrendo um comprometimento dos grandes vasos sanguíneos, como as artérias coronarianas dos membros

inferiores e as cerebrais, resultando na doença arterial coronariana, doença vascular periférica e acidente vascular encefálico (FERREIRA *et al.*, 2011).

Também foram quantificadas algumas citocinas e anticorpos com o objetivo de avaliar se a carqueja estava modulando a resposta imunológica dos animais através da alteração da produção deles, como mostra a figura 5.

Figura 5: Quantificação de citocinas e anticorpos. A: Quantificação de anticorpos da classe IgG em cada um dos grupos experimentais; B: Quantificação de anticorpos da classe IgG1 em cada um dos grupos experimentais; C: Quantificação de IFN- γ em cada um dos grupos experimentais; D: Quantificação de TGF- β em cada um dos grupos experimentais. Análise estatística realizada pelo método de Anova com pós-teste de Tukey.



Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de IgG total entre os grupos. No entanto, observa-se que os animais que receberam a carqueja apresentavam níveis numericamente superiores, o que sugere ter havido aumento na produção de anticorpos dessa classe.

Os anticorpos (Ac) ou Imunoglobulinas (Ig) são moléculas glicoprotéicas, envolvidas no reconhecimento imune específico, ligando-se especificamente ao agente patogênico que induziu a resposta imune e recrutando células e moléculas para destruir patógenos, ou seja, com função de identificar e neutralizar antígenos (Ag) (MURPHY *et al.*, 2010). São compostos por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, ambas idênticas que se ligam através de pontes dissulfetos (DEVLIN, 2011). A quantidade e as posições das cadeias pesadas conferem as diferentes classes de anticorpos,

denominadas IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, que se diferenciam entre si pelas propriedades biológicas, localizações funcionais e mecanismos de captação e eliminação de antígenos do organismo (MURPHY *et al.*, 2010).

A IgG é a imunoglobulina mais abundante no sangue e mais importante da resposta imune secundária. Possui alta afinidade para ligação antígeno específico. Atua na aglutinação, opsonização, ativação da via clássica do sistema do complemento, neutralização de toxinas e citotoxicidade dependente de anticorpos mediada por células. Pode estar associada às reações de hipersensibilidade. Conforme a disposição das cadeias pesadas e pequenas diferenças nas sequências de aminoácidos da região, diferenciam-se em quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) (KALLAUR *et al.*, 2007). Em humanos, as moléculas de IgG de todas as subclasses atravessam a barreira placentária e conferem um alto grau de imunidade passiva ao feto e ao recém-nascido (ABBAS *et al.*, 2008).

Com relação a IgG1, também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Além disso, diferente do que aconteceu com a IgG total, seus níveis nos grupos tratados se mantiveram numericamente semelhantes aos demais grupos, sugerindo que esta classe não tivesse sofrido interferência pela carqueja. Das subclasses, a IgG1 é a mais abundante, correspondendo a 65% do total, transportada com maior eficiência e rapidez (ARAUJO *et al.*, 2003). Os anticorpos das classes IgG1 e IgG3 atingem níveis séricos semelhantes aos do adulto aos dois anos de idade, podendo ser detectados desde o nascimento (BRASIL, 2006).

Segundo Witt e seus colaboradores (2011), anticorpos IgG, principalmente da classe IgG1, estão intimamente ligados ao desenvolvimento do diabetes, por resultar de uma resposta imune policlonal. No entanto, no presente trabalho, o diabetes já estava instalado antes do início do tratamento, de forma que não foi possível observar possíveis variações.

Além dos anticorpos, também foram quantificadas três citocinas. As citocinas são proteínas sintetizadas pelas células dos sistemas imune e adquirido em resposta a micro-organismos e outros antígenos. São responsáveis pela regulação e condução do processo inflamatório, porém, sua produção de forma desordenada causa desequilíbrio homeostático, desencadeando complicações metabólicas (CAMPOS *et al.*, 2016).

O interferon gama (INF- γ) mostrou-se igual em todos os grupos. Ele é uma citocina importante na imunidade na regulação das respostas imunológicas e inflamatórias e tem alguns efeitos antivirais e antitumorais. Ele é induzido por citocinas como a IL-12 e produzido por células natural-killers (NK), linfócitos natural-killers T (NKT), como parte da imunidade inata e por linfócitos T CD4⁺ Th1 e T

CD8⁺ citotóxicos (CTL), como parte da resposta imune adquirida, para recrutar leucócitos para o local de infecção e estimular os macrófagos para eliminar bactérias (MACHADO *et al.*, 2004).

No diabetes, o INF- γ tem função na regulação do sistema imune e na transição da imunidade inata para a adaptativa. Porém, em excesso, ativa ainda mais os macrófagos e impede a ação eficiente de insulina (NUNES; CORDOVA, 2017).

Em células β -pancreáticas de camundongos, o INF- γ tem papel citotóxico associado a ocorrência da insulite, mediada por células imunes, com destruição de ilhotas pancreáticas e manifestação do diabetes. Sugere-se que o aumento dessa citocina induza a destruição da ilhota e as manifestações do DM tipo 1 pelas células do infiltrado inflamatório. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a destruição das células beta, entre eles, a destruição por apoptose, onde ocorre a fragmentação de DNA típica em ilhotas pancreáticas tratadas com a combinação de IL-1 β , TNF- α e INF- γ . Outras hipóteses apontam a produção de óxido nítrico e radicais livres pelas células expostas às citocinas, estimulando a resposta imune adaptativa pró-inflamatória Th1. A cascata de eventos bioquímicos intracelulares para a destruição de células das ilhotas inicia com a liberação de IL-1, porém é potencializada pela ação principalmente do INF- γ , com a indução da liberação de óxido nítrico, ocasionando a disfunção e apoptose das ilhotas (MALAGUTI, 2007).

Outra citocina avaliada foi a IL-4 (dados não mostrados), tendo-se em vista que nos três grupos experimentais os níveis dessa citocina encontravam-se abaixo da curva de sensibilidade da reação. A IL-4 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias com ação tardia, produzida por linfócitos T CD4, mastócitos, eosinófilos e basófilos. Tem a capacidade de inibir a maioria das citocinas inflamatórias e pode suprimir a ativação de macrófagos e células microgliais (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2016). Atua sobre os linfócitos T e B, células natural *killers*, mastócitos, sinoviócitos e células endoteliais. Atua sobre macrófagos ativados, reduzindo os efeitos das citocinas IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8 e inibindo a produção de radicais livres de oxigênio. Induz a diferenciação de linfócitos B para produzir IgG e IgE. Aumenta a suscetibilidade dos macrófagos aos efeitos dos glicocorticóides (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Além do INF- γ e IL-4, o TGF- β também foi quantificado e mostrou-se numericamente superior nos grupos que receberam a carqueja.

O fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) é um potente inibidor da proliferação dos hepatócitos. Possui habilidade de inibir reversivelmente um grande número de diferentes tipos celulares, como leucócitos, além de participar de funções importantes, como a quimiotaxe de células inflamatórias, sugerindo um importante papel regulador na cicatrização de tecidos. O TGF- β é capaz

de estimular reversivelmente o crescimento de fibroblastos normais prevenindo a progressão da fibrose e facilitando a proliferação dos hepatócitos durante a regeneração (GORLA JUNIOR *et al.*, 2001).

Quando ocorre uma lesão, a área é preenchida com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. Esta agregação plaquetária e a coagulação sanguínea formam um tampão, rico em fibrina, a fim de proteger o organismo contra invasão de microrganismos e tentar reestabelecer a homeostasia. Este tampão serve como reservatório de citocinas e de fatores de crescimento que serão liberados durante o processo de regeneração. Entre os mediadores constituintes da matriz extracelular, o TGF- β participa da ativação da cascata de coagulação e do complemento, auxiliando na produção de vários mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos que auxiliam o recrutamento das células inflamatórias no local da ferida. Após a saída das plaquetas do leito vascular, neutrófilos e monócitos, em resposta aos agentes quimiotáticos, migram em direção ao leito da ferida. Além da função de fagocitose, as células inflamatórias produzem fatores de crescimento, que preparam a ferida para a fase proliferativa, quando fibroblastos e células endoteliais também serão recrutados (CANO, 2019). Os monócitos do sangue periférico se infiltram no local em resposta a agentes quimiotáticos. O macrófago ativado é a principal célula efetora do processo de reparo tecidual, degradando e removendo componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina e proteoglicanas. Além da fagocitose, os macrófagos secretam fatores quimiotáticos que atraem outras células inflamatórias ao local da ferida e produzem prostaglandinas, que funcionam como potentes vasodilatadores, afetando a permeabilidade dos vasos. Entre vários fatores de crescimento produzidos pelos macrófagos, o TGF- β auxilia a estimular a formação do tecido de granulação. A próxima fase, a proliferação, é a responsável pelo fechamento da lesão. Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local. O TGF- β ajuda na estimulação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos e se inicia a formação do tecido de granulação. A produção de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes é acompanhada por aumento da permeabilidade vascular. Na angiogênese patológica, como no caso da ferida, o aumento da permeabilidade vascular à água e às macromoléculas apresenta importante função no processo, sendo o responsável direto pela formação do edema. Várias citocinas produzidas durante o processo de cicatrização interferem diretamente na permeabilidade vascular favorecendo tanto o processo cicatricial quanto o desenvolvimento tumoral (CANO, 2019).

Sun e colaboradores (2002 *apud* LAGRANHA *et al.*, 2007) demonstraram em ratos Wistar diabéticos que os depósitos de lipídeos ocorrem mesmo sem qualquer alteração nos níveis séricos de colesterol ou triglicerídeos. Este acúmulo de triglicerídeos induz aumento do TGF- β , do fator de

crescimento endotelial vascular, além do aumento de colágeno e de fibronectina, resultando em glomeruloesclerose e em proteinúria.

Como já mencionado anteriormente, a resposta inflamatória é um mecanismo para combater agentes infecciosos ou elementos estranhos ao nosso organismo, ou seja, é uma resposta homeostática dos tecidos para remover agentes patogênicos e recuperar as funções normais (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2016). A inflamação não está associada somente às infecções, mas a vários processos que ocorrem no organismo e causam doenças. Esses processos ocorrem em cascata para a recuperação do tecido lesado e para a restauração da homeostasia do organismo (CRUVINEL *et al.*, 2010). Após o reconhecimento de uma ameaça, iniciam uma série de alterações bioquímicas e vasculares, com infiltração de várias células imunes efetoras, com função de remodelar o tecido inflamado. Os macrófagos assumem a fagocitose, o processamento e a apresentação de antígenos aos linfócitos T, ocorrendo a remoção de células apoptóticas, a indução de angiogênese, a reparação e o remodelamento de tecidos (BACHIEGA, 2011).

Além disso, durante o processo de inflamação, ocorre a liberação das espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) que contribuem para a lesão vascular, hipo-reatividade vascular e disfunção orgânica por indução de apoptose (GUIMARÃES, 2017). Os organismos expostos ao oxigênio produzem estas moléculas no seu metabolismo normal. Quando se encontra em situações patológicas, a produção de espécies reativas aumenta. O desequilíbrio entre o desafio oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante do organismo denomina-se estresse oxidativo, ou seja, trata-se de um distúrbio metabólico no qual moléculas instáveis provocam danos celulares (CAMPOS e LEME, 2018).

A resposta inflamatória pode ser ainda potencializada por um padrão de resposta celular denominada de Th1, a qual caracteriza-se pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ . Por outro lado, existe ainda a resposta Th2, caracterizada pela produção de citocinas de perfil anti-inflamatório, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e o TGF- β . As citocinas produzidas pelas células Th1 estimulam a fagocitose e destruição de micro-organismos patogênicos enquanto as citocinas da resposta Th2, geralmente estimulam a produção de anticorpos dirigidos contra grandes parasitas extracelulares (TOLEDO, 2017).

Além dos padrões Th1 e Th2 supracitados, existe um terceiro perfil denominado de Th17. Este perfil de resposta celular é responsável por produzir citocinas pró-inflamatórias, como a IL-17, potentes indutoras da inflamação, induzir a infiltração celular, a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, além de ativar mecanismos de apoptose em células potencialmente infectadas (MEDEIROS, 2016), o

que nos leva a pensar que foi esta via a precursora do processo inflamatório, concomitante a doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* induzidos. No entanto, as citocinas envolvidas nesse padrão de resposta imune não foram quantificadas no presente estudo.

O diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença autoimune crônica, onde as células beta pancreáticas são destruídas e ocorre a dependência pela insulina exógena. Os anticorpos, principalmente da classe IgG1, participam da resposta imune secundária, resultando em anormalidades metabólicas. Por outro lado, o perfil de secreção de citocinas durante o DM1 é de padrão Th1, com liberação de IL-2 e IFN- γ . O IFN- γ diminui a produção de insulina pelas células beta pancreáticas, porém, em excesso, acaba impedindo a ação eficiente da insulina. Já as citocinas de resposta Th2 tentam bloquear a evolução do DM1 com secreção de IL-4, IL-6 e IL-10. A IL-4 parece ter um efeito protetor no DM1 contra a autoimunidade por inibição da resposta Th1, reduzindo os auto-antígenos específicos das células beta. As duas respostas (Th1 e Th2) são antagônicas, porém complementares. Mas, por se tratar de uma doença que possui característica de doença autoimune, pode-se cogitar que a via Th17 participe deste processo, com a produção de citocinas pró-inflamatórias, indução de infiltração celular, além de mediar mecanismos de apoptose em células potencialmente infectadas. No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas estatisticamente nos anticorpos IgG e IgG1. O IFN- γ permaneceu igual em todos os grupos tratados. A IL-4 apresentou concentrações séricas muito baixas, a ponto de não ser detectada, provavelmente porque a lesão pancreática causada pela administração em dose elevada de STZ tenha causado agressão aguda e a resposta Th2 protetora do sistema imunológico adaptativo não teve tempo para desencadear a cascata de reações. As dosagens de TGF- β apresentaram-se ligeiramente aumentadas, demonstrando o efeito anti-inflamatório já mencionado da carqueja.

As doenças cardiovasculares afetam o coração e o sistema circulatório e são causadas por inúmeros fatores de risco, como sedentarismo, tabagismo, estresse, obesidade, hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia, entre outros. O processo inflamatório é o elo entre a síndrome metabólica e as doenças cardiovasculares. Para avaliar o grau de inflamação, existem vários biomarcadores como citocinas pró-inflamatórias, citocinas anti-inflamatórias, adipocinas, marcadores de inflamação derivados de hepatócitos, marcadores de consequência da inflamação, enzima, entre outros. A predisposição ao risco de desenvolvimento de Síndrome Metabólica é maior em pessoas obesas, onde a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos é maior, associada aos altos níveis de citocinas. As citocinas pró-inflamatórias mais relevantes são IL-6, TNF- α , IL-8, IL-1 β , CD40 e CD40L. O TNF- α é considerado um marcador para infarto do miocárdio e está correlacionado com componentes da Síndrome Metabólica. Em pessoas com DCV, seus níveis são elevados. Vale ressaltar

que o tecido adiposo secreta ativamente diversas citocinas pró-inflamatórias, sendo que a associação entre o grau da obesidade e a inflamação é esperada. Porém, a associação entre os componentes da Síndrome Metabólica e marcadores de inflamação ocorrem independente do grau de obesidade. Neste estudo, os níveis de INF- γ estavam iguais, estatisticamente, porém, menores em relação ao grupo de animais saudáveis, comprovando a ação anti-inflamatória da carqueja.

4 CONCLUSÃO

Foi avaliada neste trabalho a atividade imunomoduladora da *Baccharis trimera* em ratos Wistar com doença cardiovascular e diabetes *mellitus* induzidos, caracterizando e correlacionando a concentração de citocinas e anticorpos produzidos, o perfil hematológico, o peso do baço e o perfil histopatológico dos animais, quando submetidos a diferentes doses da fração solúvel da carqueja em etanol. Analisando todos os resultados, concluiu-se que o tratamento com *B. trimera* nas doses de 30, 100 e 300mg kg⁻¹ não alteraram significativamente o hemograma; a concentração de hemoglobina mostrou-se numericamente superior ao C- e muito semelhante ao controle basal; foi observada uma tendência numérica na diminuição no número de neutrófilos e monócitos circulantes, conforme o aumento da dose, apesar de estarem superiores ao C-. Em relação ao número de leucócitos circulantes, observou-se nos grupos CQ100 e CQ300 um valor maior em relação ao basal. O peso relativo do baço estava aumentado no C-, enquanto o basal e os grupos CQ100 e CQ300 ficaram iguais. Não houve diferença estatística significativa na concentração de IgG total e IgG1 entre os grupos. O INF- γ mostrou-se igual em todos os grupos. A IL-4 estava muito baixa nos animais a ponto de não ser detectada. O TGF- β mostrou-se numericamente superior nos grupos que receberam a carqueja, o que faz sugerir que provavelmente a precursora do processo inflamatório, concomitante às doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* foi a via Th17, com a produção de citocinas pró-inflamatórias, indução de infiltração celular, além de mediar mecanismos de apoptose em células potencialmente infectadas. Embora conclua-se que a carqueja tenha atividade imunomoduladora, pesquisas com doses e tempos maiores e avaliação de outros marcadores imunológicos são necessárias para elucidar o comportamento do sistema imunológico em relação às doenças, bem como estudos para a explicação completa da ação da via Th17 no processo inflamatório em modelos com doenças cardiovasculares e diabetes induzidos associados.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Coordenadoria de Pós-Graduação (COPG) da Universidade Paranaense – UNIPAR e da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FA).

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ANDRADE, Viviane Abreu; ARAÚJO-JORGE, Tania Cremonini; COUTINHO-SILVA, Robson. Concepções discentes sobre imunologia e sistema imune humano. **Investigações em Ensino de Ciências**. Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, dez. 2016.

ARAUJO, Maria A.; DEFFUNE, Elenice; CARLOS, Luciana M. B.; MAGALHÃES, Silvia M. M.; GOLIM, Márjorie A.; CÂMARA, Lília M. C. Avaliação das subclasses IgG1 e IgG3 na doença hemolítica perinatal. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São José do Rio Preto, v. 25, n. 4, 2003.

BACHIEGA, Tatiana Fernanda. **Produção de citocinas pró e anti-inflamatórias por macrófagos estimulados *in vitro* com própolis, alecrim-do-campo, capim-limão e cravo-da-índia**. 2011. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, 2011.

BARBALHO, Sandra Maria; BECHARA, Marcelo Dib; QUESADA, Karina; GABALDI, Márcia Rocha; GOULART, Ricardo de Alvares; TOFANO, Ricardo José. Síndrome metabólica, aterosclerose e inflamação: uma tríade inseparável? **Jornal Vascular Brasileiro**, Porto Alegre, v. 14, n. 4, out./dez. 2015.

BARROSO, G.M.; BUENO, O. L. **Compostas: subtribo Baccharidinae**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2002.

BOBEK, Vanessa Barbosa. **Análise farmacobotânica comparativa de espécies de *Baccharis* L. (Asteraceae) da região dos Campos Gerais**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFPR, Curitiba, 2015.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Decreto n.º 5.813, de 22 de junho de 2006. **Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências**. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual dos Centros de Referência para imunobiológicos especiais**. Brasília, DF, 2006. 188 p. - (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2006. 60 p. - (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília, 2006. 148 p. - (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

BRUNING, Maria Cecilia Ribeiro; MOSEGUI, Gabriela Bittencourt Gonzalez; VIANNA, Cid Manso de Melo. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 10, p. 2675-2685, out. 2012.

BUDEL, Jane Manfron; DUARTE, Marcia do Rocio. Análise morfoanatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC. e *B. trimera* (Less.) DC., Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 45, n. 1, jan./mar. 2009.

CAMPOS, Diego Lucas; PONTES, Leandro Fantin; TORRES, Fernanda; SILVA, Jucélia Nunes; TERRA JUNIOR, André Tomaz. Uma abordagem sobre a inter-relação de citocinas na artrite reumatóide. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 7, n. 1, p. 93-102, jan./jun. 2016.

CAMPOS, Marco Túlio Gomes; LEME, Fabíola de Oliveira Paes. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. **Pubvet**, v.12, n. 1, p.1-8, jan. 2018.

CANO, Rodrigo das Neves. **Papel da MMP-9 e do TGF- β na expressão de componentes da matriz extracelular por fibroblastos gengivais de camundongos normais e diabéticos com doença periodontal *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Faculdade de Odontologia UNESP, Araçatuba, 2019.

COELHO, Lorena Fagundes. **Análise morfológica do fígado e baço de camundongos Balb/c submetidos à desnutrição protéico-calórica e infectados com *Leishmania infantum***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

COUTINHO, Marcela A. S.; MUZITANO, Michelle F.; COSTA, Sônia S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, jul./set. 2009.

CRUVINEL, Wilson de Melo; MESQUITA JUNIOR, Danilo; ARAUJO, Julio Antônio Pereira; CATELAN, Tânia Tiek Takao; SOUZA, Alexandre Wagner Silva; SILVA, Neusa Pereira; ANDRADE, Luis Eduardo Coelho. Sistema imunitário - Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 4, jul./ago. 2010.

DEVLIN, Thomaz M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 3. ed. São Paulo: Blucher, 2011.

FERREIRA, Leandro Tadeu; SAVIOLLI, Israel Hideo; VALENTIN, Vitor Engrácia; ABREU, Luiz Carlos. Diabetes *melito*: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36, n. 3, p. 182-8, set./dez. 2011

FERREIRA, Pablo de Ataíde. **Desenvolvimento de forma farmacêutica sólida à base de *Baccharis trimera* (Less.) DC. para o tratamento da artrite reumatóide**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

GONDIM, Taiane de Macêdo; MORAES, Laise Eduarda Paixão; FEHLBERG, Italaney; BRITO, Vanessa da Silva. Aspectos fisiopatológicos da dislipidemia aterogênica e impactos na homeostasia. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 2, jun./jul. 2017.

GORLA JUNIOR, José Antônio FAGUNDES, Djalma José; PARRA, Osório Miguel; ZAIA, Cássia Thaís Bussamra Vieira; BANDEIRA, César Orlando Peralta. Fatores hematotróficos e regeneração hepática. Parte II: fatores de crescimento. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 16, n. 4, out./dez. 2001.

GRANCE, Simone Reschke Mendes; TEIXEIRA, Maria Araújo; LEITE, Roseana Silveira; GUIMARÃES, Eurípedes Batista; SIQUEIRA, João Máximo; FILIU, Wander Fernando de Oliveira; VASCONCELOS, Simone Bertozzi de Souza; VIEIRA, Maria do Carmo. *Baccharis trimera*: efeito sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação hepatorenal em ratas prenhes. **Jornal de Etnofarmacologia**, v. 117, n. 1, p. 28-33, abr. 2008.

GUIMARÃES, Paulo de Souza Fonseca. **Avaliação de células natural killers (NK) em sangue de circulação periférica e fluido de lavado bronco-alveolar de pacientes portadores de sepse pulmonar: estudo de casos-controle**. 2017. Tese (Doutorado em Fisiologia) – UFPR, Curitiba, 2017.

JACOMASSI, Ezilda; LOURENÇO, Emerson Luiz Botelho; NARITA, Emília; CANZI, Karina Nataly; ZARDO, Andressa; OTÊNIO, Joice Karina; SILVEIRA, Wueslei de Lira; FREITAS, Andressa Tailine Ferreira; SILVA, Vanilson Rodrigues; SIVA, Cecília Cividini Monteiro. **Horto Medicinal do Campus 2 da UNIPAR: cultivando o bem-estar com a implantação de hortas comunitárias nas Unidades de Saúde**. Umuarama: UNIPAR, 2017.

KALLAUR, Ana Paula; BUQUI, Gabriela Amaral; SABINO, Guilherme Critiani; MASTELLARI, Rosiane Batista; MORIMOTO, Helena Kaminami; VOGLER, Ingridt Hildegard; REICHE, Edna Maria Vissoci. Frequência das alterações dos níveis séricos de imunoglobulinas dos pacientes atendidos no Hospital Universitário, Londrina, Paraná. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 23-32, jan./jun. 2007.

KARAM, T.K.; DALPOSSO, L. M.; CASA, D. M.; DE FREITAS, G. B. L. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 2, p. 280-286, 2013.

LAGRANHA, Claudia J.; FIORINO, Patricia; CASARINI, Dulce Elena; SCHAAN, Beatriz D'Agord; IRIGOYEN, Maria Claudia. Bases moleculares da glomerulopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 51, n. 6, ago. 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MACHADO, Paulo R. L.; ARAUJO, Maria Ilma A. S.; CARVALHO, Lucas; CARVALHO, Edgar M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, Nov./dez. 2004.

MALAGUTI, Carina. **Avaliação dos efeitos da diacereína na modulação dos diabetes mellitus e na expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , INF- γ e IL-12 em ilhotas β -pancreáticas**

e células espênicas no camundongo NDO (non obese diabetic). Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MBIANTCHA, Marius; ALMAS, Jabeen; SHABAN, Simjee U.; NIDA, Dastagir; AISHA, Faheem. Propriedade anti-artrítica de extratos brutos de *Piptadeniastrum africanum* (Mimosaceae) na artrite induzida por adjuvas completas de Freund em ratos. **BMC Medicina Alternativa e Complementar**, v. 17, n. 1, p. 111, 2017.

MEDEIROS, Rúbia Marília. Citocinas e a modulação da resposta imune durante a infecção pelo HIV - Suscetibilidade à infecção e progressão para AIDS. **LUME UFRGS**, Porto Alegre, maio 2016.

MOUTIA, Mouna; SEGHROUCHNI, Omar; ELOUADDARI, Anass; JAHID, Abdellah Al; ELHOU, Abdelhalim; NADIFI, Sellama; EDDINE, Jamal Jamal; HABTI, Norddine; BADOU, Abdallah. *Allium sativum* L. regula a expressão do gene IL-17 *in vitro* em células mononucleares do sangue periférico humano. **BMC Medicina Alternativa e Complementar**, v. 16, n. 1, p. 377, 2016.

MURPHY, Kenneth; TRAVERS, Paul; WALPORT, Mark. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artemed, 2010.

NUNES, Roberta; CORDOVA, Caio Mauricio Mendes. Citocinas de resposta Th1 e Th2 e diabetes mellitus tipo 1. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 4, nov./dez. 2017.

NUNES PINHEIRO, Diana Célia Sousa; LEITE, Ana Karine Rocha de Melo; FARIAS, Viviane Moura; BRAGA, Luziana Tavares; LOPES, Cláudio Afonso Pinho. Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: perspectivas em medicina veterinária. **Ciência Animal**, v. 13, n. 1, p. 23-32, 2003.

OLIVEIRA, Caio Marcio Barros; SAKATA, Rioko Kimiko; ISSY, Adriana Machado; GEROLA, Luis Roberto; SALOMAO, Reynaldo. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 61, n. 2, mar./abr. 2011.

OLIVEIRA JUNIOR, José Oswaldo; PORTELLA JUNIOR, Caio Sander Andrade; COHEN, Cláudia Panossian. Mediadores inflamatórios da dor neuropática. **Revista da Dor**, São Paulo, v. 17, n. 1, 2016.

PERON, Ana Paula; FELIPES, Joice; MATTGE, Giselle Ivone; CANTAGALLI, Liriana Belizário; MARIUCCI, Rosinete Gonçalves; VICENTINI, Veronica Elisa Pimenta. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 2, p. 127-130, abr./jun. 2008.

PRÉCOMA, D. B. *et al.* Atualização da Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 4, p. 787-891, 2019.

ROCHA, Francisco Angelo Gurgel; ARAUJO, Magnólia Fernandes Florêncio; COSTA, Nilma Dias; SILVA, Roberto Pereira. O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos**, v. 1, 2015.

RODRIGUES, Carmem R.F.; DIAS, Jacqueline H.; MELLO, Rodrigo N.; RICHTER, Marc F.; PICADA, Jaqueline N.; FERRAZ, Alexandre B.F. Propriedades genotóxicas e antigenotóxicas de *Baccharis trimera* em camundongos. **Jornal de Etnofarmacologia**, v. 125, n. 1, p. 97-101, ago. 2009.

RUIZ, Ana Lucia T. G.; TAFFARELLO, Denise; SOUZA, Vanessa H. S.; CARVALHO, João E. Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 295-300, abr./jun. 2008.

SANTOS, Lucas Correia; SANTOS, Matheus Correia; SANTOS, Guilherme Mateus Carvalho; LIMA, Luiz Eduardo Rezende; BASTOS, Talita Santos. Tabagismo e sua relação com a trombose venosa. **Fisiologia Cardiovascular**, Aracaju, Anais 2017. Aracaju: Universidade Tiradentes, out. 2017.

SCHEK, Gabriele. **Plantas medicinais e o cuidado em saúde em famílias descendentes de pomeranos no sul do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

SEYDRIED, M.; SOLDERA-SILVA, A.; BOVO, F.; STEVAN-HANCKE, F. R.; MAURER, J. B. B.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F. **Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v. 18, n. 1, jan./mar. 2016.

SILVA, Aurea Virginia Andrade. **Estudo imunopatológico do baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum***. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

SOARES, Denise Josino; MOURA NETO, Luis Gomes; DAMACENO, Marlene Nunes; SOUZA, Pahlevi Augusto; BRAGA, Renata Chastinet; BRASIL, Isabella Montenegro. **Anti-inflammatory activity of plant products**. Saúde em Revista, Piracicaba, v. 15, n. 39, p. 33-45, jan./abr. 2015.

SOUZA, Aucirlei Almeida; ALBERNAZ, Alessandro Caetano; ROCHA SOBRINHO, Hermínio Maurício. Diabetes *melito* tipo 1 autoimune: aspectos imunológicos. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 53-65, jan./jun. 2016.

SOUZA, Marília Moraes Queiroz; SILVA, Gustavo Ratti; COLA, Itaruã Machri; SILVA, Anieli Oliveira; SCHAEGLER, Maysa Isernhagen; GUARNIER, Lucas Pires; PALOZI, Rhanany Alan Calloi; BARBOZA, Lorena Neris; MENETRIER, Jacqueline Vergutz; FROELICH, Diego Lacir; AUTH, Pablo Alvarez; VEIGA, Alan de Almeida; SOUZA, Lauro Mera; LOVATO, Evelyln Claudia Wietzikoski; RIBEIRO-PAES, João Tadeu; GASPAROTTO JUNIOR, Arquimedes; LIVERO, Francislaine Aparecida Reis. *Baccharis trimera* (Less.) DC: Um fitoterápico cardioprotetor inovador contra múltiplos fatores de risco para doenças cardiovasculares. **Journal of Medicinal Foods**, v. 00, n. 0, set. 2019.

SUN, G.; HALAIHEL, N.; ZHANG, W.; ROGERS, T.; LEVI, M. Papel da proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol na regulação do metabolismo lipídico renal e da glomerulosclerose no diabetes mellitus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 21, 2002.

TOLEDO, André Oliveira Naufel. **Participação de citocinas relacionadas às respostas Th17/Treg na inflamação periapical inflamatória crônica**. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

TOMAZZONI, Marisa Ines; NEGRELLE, Raquel Rejane Bonato; CENTA, Maria de Lourdes. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapeuta. *Texto & Contexto - Enfermagem*, Florianópolis, v. 15, n. 1, jan./mar. 2006.

VAN VUUREN, S.; HOLL, D. Pesquisa de produtos naturais antimicrobianos: uma revisão da perspectiva da África do Sul para os anos 2009-2016. *Jornal de Etnofarmacologia*, v. 208, p. 236-252, jul. 2017.

WITT, Alana Rocha Schmidt; PACHECO, Aline Mara; BRATZ, Fernanda; LAZZARI, Malísia Balestrin; BUFFON, Marjorie Piuco; LARA, Gustavo Muller. Marcadores imunológicos da diabetes *mellitus* do tipo 1 – revisão. *Revista Conhecimento Online*, v. 2, set. 2011.