

Efeito anti-inflamatório do composto ácido *p*-cumárico isolado da própolis verde, em modelo *in vivo*

Autores: Giovanna Doria Pares Coelho¹, Karina Furlani Zoccal²

Colaboradores: Juliana Cogo Ferreira³, Cristiane Tefé da Silva⁴

^{1,2,3,4}Centro Universitário Barão de Mauá

⁽¹⁾*giihdoria@hotmail.com (Graduação Medicina)*, ⁽²⁾*karina.zoccal@baraodemaua.br*

Resumo

A própolis verde, da espécie *Baccharis dracunculifolia*, tem demonstrado importante atividade anti-inflamatória. Esta, desempenha um papel importante, sendo utilizada a fim de evitar a cronificação do processo inflamatório. O estudo avaliou o efeito anti-inflamatório, do ácido *p*-cumárico (*ApC*), isolado da própolis verde, em modelo de inflamação aguda, observando a diminuição do recrutamento de leucócitos e da produção de mediadores inflamatórios.

Introdução

Há muito tempo, compostos naturais e plantas medicinais são usados para fins cosméticos e médicos. Nas últimas décadas, estudos têm demonstrado o efeito anti-inflamatório de diversos compostos naturais (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016). Dados publicados recentemente do nosso grupo demonstrou que o extrato hidroalcolólico de *Arctium lappa* (*Alhe*) apresenta potencial anti-inflamatório pela diminuição de recrutamento celular e produção de citocinas inflamatórias (NASCIMENTO et al., 2019). Sabe-se que quase 80% da população mundial, principalmente países subdesenvolvidos, dependem do uso de plantas e seus metabólitos bioativos para cuidados de saúde (MBUNI et al., 2020).

A própolis verde, da espécie *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), vem sendo bastante estudada, e tem demonstrado atividades biológicas, tais como, antimicrobiana (SALOMÃO et al., 2004), anti-inflamatória (PAULINO, 2005), antioxidante (NAKANISHI et al., 2003) e antitumoral (AKAO et al., 2003). Mais especificamente, na medicina popular, a espécie *B. dracunculifolia*, está sendo usada para o tratamento de doenças inflamatórias gastrointestinais (DA SILVA FILHO et al., 2008)

A resposta inflamatória ocorre como mecanismo de contenção a um estímulo indutor que causa dano tecidual e, durante esse processo, sistemas bioquímicos, como cascata de coagulação e

sistema complemento, são ativados para estabelecer e conter a inflamação (CRUVINEL et al., 2010).

As alterações no local do dano tecidual ocorrem por meio da ação de mediadores inflamatórios específicos para natureza do estímulo, como exemplo as citocinas, principalmente, fator de necrose tumoral (TNF)- α e interleucina (IL)-1, liberadas por macrófagos; histaminas, prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas (PAF), fatores do sistema complemento (Ca, C5a, principalmente) e fatores da cascata de coagulação (BUCKLEY et al., 2013; GILROY et al., 2004; PAUL, 1999).

Neste contexto, as respostas à inflamação desempenham um papel importante em várias doenças com alta prevalência na população, como hepatite (MATSUZAKI et al., 2007), doença pulmonar (YANG et al., 2013) e doença de Alzheimer (JAYARAMAN; LENT-SCHOCHET; PIKE, 2014). E também estão centralmente relacionados à patogênese de um grande número de doenças agudas e crônicas, como artrite reumatoide (YANG et al., 2013), resposta inflamatória do cólon (TAKHSHID et al., 2012) e periodontite (FARHAD et al., 2013). No entanto, as terapias convencionais para a inflamação, utilizadas a fim de evitar a cronificação do processo inflamatório, bem como o desenvolvimento de outras doenças, como as autoimunes, inclui esteroides e medicamentos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (CARRASCO-POZO et al., 2016; SOSTRES et al., 2010), sendo que estes demonstram muitos efeitos colaterais.

Desta forma, investigamos o efeito do composto ácido *p*-cumárico (*ApC*) em modelo de inflamação aguda, pelo fato da espécie de *B. dracunculifolia* causar distúrbios mínimos nas funções fisiológicas do organismo, ter ação inespecífica e exercer ação terapêutica independente da direção do estado patológico.

Objetivos

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito anti-inflamatório, *in vivo*, do ApC, isolado da própolis verde, em modelo de inflamação aguda.

Objetivos específicos:

- ✓ Demonstrar o recrutamento de leucócitos e produção de mediadores inflamatórios, após a administração do ApC, na presença ou ausência do lipopolissacarídeo (LPS);
- ✓ Comparar a resposta anti-inflamatória do composto estudado com indometacina.

Materiais e Métodos

Animais: Camundongos da linhagem Balb/c, pesando aproximadamente 22 g, foram mantidos no biotério do Centro Universitário Barão de Mauá, em ambiente com umidade, onde receberam dieta padrão e água livre. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação animal (CEPAN), do Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto (número do protocolo 346/19).

Isolamento e preparo do composto ácido *p*-cumárico: Um quilograma de própolis verde, fornecidas pela empresa Apis Flora Ltda foram congeladas, pulverizadas em moinho de facas e submetidas à maceração em solução hidroalcolólica 7:3, seguida de percolação, a cada três dias, por três vezes consecutivas. A solução hidroalcolólica obtida foi devidamente filtrada e evaporada em rotaevaporador e, em seguida, liofilizada com a finalidade de se obter o extrato hidroalcolólico bruto. O extrato obtido foi posteriormente submetido tanto à cromatografia líquida a vácuo (CLV), quanto à cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC – *High Speed counter current Chromatography*). As frações obtidas foram reunidas e purificadas em sistema preparativo CLAE-UV (Shimadzu), utilizando coluna preparativa C8 (Shimadzu Shim-pack prep.-ODS) e sistema de eluição por gradiente MeOH/água, fornecendo o ácido *p*-cumárico. O composto foi suspenso em 997 µL de PBS 1x (tampão de fosfato salino) e 3 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) - final concentração 1mg/mL).

Indução de *air pouch* (cavidade de ar estéril) e injeção de estímulos: Este modelo consiste da formação de uma cavidade artificial e estéril no dorso dos animais a partir da injeção subcutânea de ar estéril. Inicialmente, os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.) com xilasina (15 mg/kg) e quetamina (80 mg/kg). Depois foi

injetado 3 mL de ar estéril no dorso dos animais via subcutânea com uma agulha de 25 G através de um filtro estéril (Millex GV 0.22 µm—Merck Millipore Ltd, Tullagreen, IRL). O dia da injeção foi considerado como o primeiro dia. Três dias após, foram injetados mais 3 mL de ar estéril. No sexto dia após a primeira inoculação de ar, os animais receberam 1 mL de Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) ou lipopolissacarídeo (LPS - 1 µg/mL) dentro do *air pouch* (FRONZA et al., 2016). E após 1 hora, os animais foram tratados ou não, com a ApC (1000 µg/kg) ou indometacina (5 mg/kg), conforme demonstrado na tabela 01:

Tabela 01 – Grupos experimentais

Grupo	Estímulo (1)	Estímulo (2) – após 1h
Controle	1 mL de PBS	1 mL de PBS
LPS	1 mL de LPS	1 mL de PBS
LPS+ApC	1 mL de LPS	1 mL ApC (1000 µg/kg)
Indometacina	1 mL de LPS	1 mL de indometacina

Após 4 h da última injeção, os animais foram eutanasiados com superdose anestésica e as bolsas de ar lavadas com 2 mL de PBS estéril. Com auxílio de uma pipeta ou ponteira de 1000 µL, os lavados foram coletados e utilizados para contagem total e diferencial de células. Após centrifugação dos lavados, os fluidos foram guardados a -20°C para posterior quantificação de mediadores inflamatórios. As bolhas foram coletadas para análise histopatológica da pele subcutânea.

Avaliação do acúmulo de leucócitos dentro da cavidade: Após a eutanásia dos animais, 2 mL de PBS estéril foram injetados dentro da bolha, a qual foi massageada gentilmente por 1 minuto. O Lavado da Cavidade (LC) foi coletado individualmente e conservado em gelo. Para contagem do número total de células presentes no LC, foram retiradas 20 µL de cada amostra, as quais foram diluídas em 380 µL de solução de Turk. A contagem diferencial das células foi feita em esfregaços, preparados em citocentrífuga e corados pelo corante Panótico (Laborclin, Paraná, Brasil). Foram contadas 100 células em diferentes campos, com aumento de 100x, em microscópio óptico.

Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA): Os sobrenadantes da cavidade de ar foram empregados para avaliação de produção das citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-alpha (R&D Systems, Minneapolis, EUA). As concentrações foram determinadas empregando anticorpos de captura, citocinas padrão e anticorpos associados à biotina e amplificados com estrepto-avidina-peroxidase. Como substrato foi utilizado tetrametilbenzidina (TMB) e a reação foi bloqueada adicionando ácido sulfúrico 1M

(H₂SO₄) aos poços. A leitura das amostras foi feita em filtro de 450 nm. As concentrações de citocinas foram determinadas utilizando uma curva padrão criada com a citocina recombinante adequada (expressos em pg/mL). Esta dosagem foi realizada no laboratório de imunologia da Profa Dra Lúcia Helena Faccioli (FCFRP-USP).

Quantificação de proteínas: O extravasamento de proteínas foi avaliado no sobrenadante livre de células pelo método de Bradford, empregando “kit” comercial (Pierce, Rockford, USA), conforme especificações do fabricante. Esta dosagem foi realizada no laboratório de imunologia da Profa Dra Lúcia Helena Faccioli (FCFRP-USP).

Análises estatísticas: Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram analisados por teste ANOVA seguido do pós-teste de comparações Múltiplas de Tukey's. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0.005$.

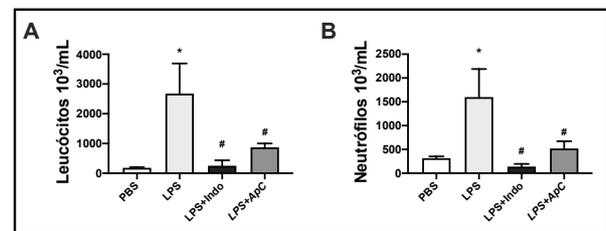
Resultados e Discussão

ApC suprime o recrutamento de células em modelo de inflamação aguda induzida por LPS

Sabe-se que a indometacina é um medicamento do tipo anti-inflamatório não esteroide, sendo um inibidor não seletivo da cicloxigenase (COX) que inibe a COX-1 e a COX-2 e é usado para tratar uma variedade de doenças inflamatórias (BRUNTON et al., 2008). No entanto, pode induzir efeitos colaterais, como gastrite, disfunção renal e disfunção plaquetária (BRUNTON et al., 2008), que podem ser prejudiciais para pacientes, especialmente se apresentarem disfunção multiorgânica resultante de tempestade de citocinas. Assim, a resposta à injeção subcutânea do composto ApC em camundongos foi estudada, no intuito de comparar a função anti-inflamatória com a resposta induzida pela indometacina, além de avaliar o comportamento do composto *per se* na bolha inflamada. Durante a resposta inflamatória aguda, dependendo do estímulo, o primeiro evento é o recrutamento de neutrófilos, seguido pela chegada de outras células, incluindo macrófagos e linfócitos (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; MEDZHITOV, 2007). Neste contexto, demonstramos primeiramente a resposta à injeção subcutânea do composto ApC em camundongos pela avaliação do influxo de leucócitos para a cavidade estéril. PBS, ApC ou indometacina foram inoculados em camundongos na presença ou ausência de estímulo inflamatório, LPS (1µg/Kg em 1mL). Após 4h da injeção, como esperado, observamos recrutamento de leucócitos e neutrófilos nos animais que receberam LPS, quando comparado ao controle PBS (Figs. 1A e

1B, respectivamente). No entanto, quando os animais com bolsas de ar inflamadas, receberam ApC ou indometacina, demonstramos diminuição no recrutamento de leucócitos (Fig. 1A), principalmente de neutrófilos (Fig. 1B), quando comparado ao LPS. Além disso, observamos que ApC apresentou redução no recrutamento de leucócitos (Fig. 1A) e neutrófilos (Fig. 1B) similar à injeção com indometacina, quando comparado ao grupo LPS.

Figura 01. ApC reduz o recrutamento de células sob condições inflamadas. Bolsas de ar foram inoculadas com PBS ou LPS e, após 1 hora, foram inoculados PBS, Indo ou ApC. Após 4 horas da última inoculação, os leucócitos e neutrófilos foram avaliados. Os resultados são apresentados como média±SEM (n=5). Análise estatística significativa para $p < 0.005$, utilizando ANOVA. *PBS versus LPS; #LPS versus LPS+Indo ou LPS+ApC.

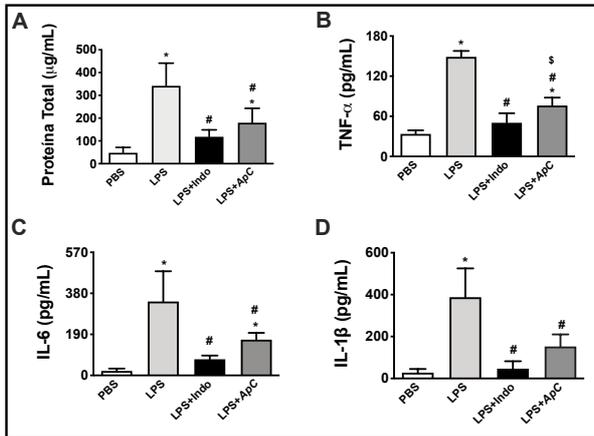


O extravasamento proteico e a produção de citocinas induzidos pelo LPS são diminuídos pela ação de ApC

O extravasamento proteico com a consequente formação de edema local foi observado após 4 horas da última inoculação de ApC. Como esperado, houve aumento de proteínas totais nos animais que receberam LPS, quando comparados ao controle PBS (Fig. 2A). Entretanto, quando os animais com bolsas de ar inflamadas, receberam ApC ou indometacina, observamos diminuição considerável de extravasamento proteico, quando comparado ao LPS (Fig. 2A). Após a injeção de estímulos, uma variedade de citocinas são liberadas e o resultado da resposta inflamatória é ditada por números de fatores que incluem a duração do estímulo e o balanço entre as respostas pró e anti-inflamatórias (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011). Assim, a produção de citocinas, como TNF-α, IL-6 e IL-1β, como mecanismo da resposta inflamatória foi analisada após 4 horas da última injeção. Como esperado, observamos aumento na produção de TNF-α (Fig. 2B), IL-6 (Fig. 2C) e IL-1β (Fig. 2D) nos animais que receberam LPS, quando comparado ao controle PBS. Contudo, quando os animais com bolsas de ar inflamadas, receberam ApC ou indometacina, observamos diminuição significativa da produção de citocinas (Figs. 2B, 2C e 2D), quando comparado ao LPS. Além disso, notamos que o composto ApC apresentou redução na

formação de edema (visto pela dosagem de proteínas) e na liberação de citocinas, semelhante aos resultados demonstrados pela indometacina. Em conjunto, nossos dados demonstram que o ApC tem papel anti-inflamatório na inflamação aguda.

Figura 02. ApC reduz o edema e a produção de citocinas induzida pelo LPS. Bolsas de ar foram inoculadas com PBS ou LPS e, após 1 hora, foram inoculadas PBS, Indo ou ApC. Após 4 horas da última inoculação, os lavados das bolsas de ar, foram coletados, conforme descrito em Materiais e Métodos. As citocinas TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-1- β (D) foram avaliadas por ELISA. No lavado da bolsa de ar, a proteína total (A) foi avaliada pelo método de Bradford; e as citocinas foram avaliadas por ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n=5). Análise estatística significativa para $p < 0.0001$, utilizando ANOVA. *PBS versus LPS ou LPS+ApC; #LPS versus LPS+Indo ou LPS+ApC; §LPS+Indo versus LPS+ApC.

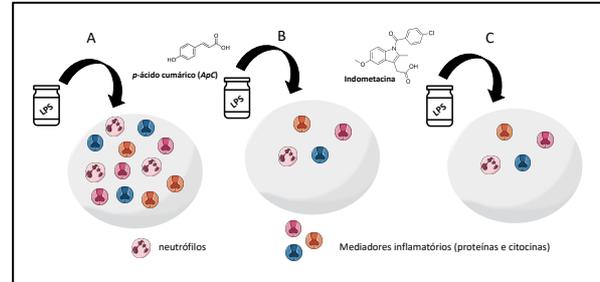


Conclusão

Esses achados apoiam a ideia de que a administração do composto ApC pode contribuir para a redução da inflamação, pois nós demonstramos que ApC apresenta resultados semelhantes à ação da indometacina em modelo de inflamação aguda, diminuindo o recrutamento de neutrófilos e a produção de citocinas inflamatórias (Fig. 3). Assim, os dados favorecem a descoberta de novos compostos com ação terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias. Dessa forma, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na ativação de leucócitos e modulação da resposta imune.

Figura 03. Figura esquemática da ação do composto ApC. (A) Ação do estímulo inflamatório (LPS) na bolsa de ar (modelo de *air pouch*), com aumento de neutrófilos, proteínas e citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1- β). (B) Ação do composto ácido cumárico (ApC) na bolsa de ar inflamada pelo LPS, com diminuição de neutrófilos, proteínas e citocinas

inflamatórias. (C) Ação da indometacina na bolsa de ar inflamada pelo LPS, com diminuição de neutrófilos, proteínas e citocinas inflamatórias. Desta forma o composto ApC apresenta potencial anti-inflamatório semelhante a indometacina em modelo de inflamação aguda.



Referências

AKAO, Y. *et al.* Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 7, p. 1057–1059, jul. 2003.

AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 10, 1 out. 2016.

BRUNTON, L. L. *et al.* **Goodman and Gilman's manual of pharmacology and therapeutics**. New York: McGraw-Hill, 2008.

BUCKLEY, C. D. *et al.* The resolution of inflammation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 1, p. 59–66, jan. 2013.

CARRASCO-POZO, C. *et al.* Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF- κ B and Nrf2. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 27, p. 289–298, jan. 2016.

CRUVINEL, W. DE M. *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–447, ago. 2010.

DA SILVA FILHO, A. A. *et al.* Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 63, n. 1–2, p. 40–46, fev. 2008.

FARHAD, S. Z. *et al.* The effect of adjunctive low-dose doxycycline and licorice therapy on gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in

chronic periodontitis. **Dental Research Journal**, v. 10, n. 5, p. 624–629, set. 2013.

FRONZA, M. *et al.* Hyaluronidase decreases neutrophils infiltration to the inflammatory site. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]**, v. 65, n. 7, p. 533–542, jul. 2016.

GILROY, D. W. *et al.* A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 3, p. 489–498, mar. 2004.

JAYARAMAN, A.; LENT-SCHOCHET, D.; PIKE, C. J. Diet-induced obesity and low testosterone increase neuroinflammation and impair neural function. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, p. 162, 16 set. 2014.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International Reviews of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 16–34, fev. 2011.

MATSUZAKI, K. *et al.* Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 46, n. 1, p. 48–57, jul. 2007.

MBUNI, Y. M. *et al.* Medicinal Plants and Their Traditional Uses in Local Communities around Cherangani Hills, Western Kenya. **Plants**, v. 9, n. 3, p. 331, mar. 2020.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819–826, 18 out. 2007.

NAKANISHI, I. *et al.* Efficient radical scavenging ability of artemisinin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 1, n. 9, p. 1452–1454, 23 abr. 2003.

NASCIMENTO, B. A. C. *et al.* Arctium lappa Extract Suppresses Inflammation and Inhibits Melanoma Progression. **Medicines (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 3, 29 jul. 2019.

PAUL, W. E. (ED.). **Fundamental Immunology**. 4th edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

PAULINO, N. Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato padronizado de própolis p1 e de seu principal constituinte ativo, Artepillin c ®. **Tese (Doutorado)** Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis p. 137, 2005.

SALOMÃO, K. *et al.* Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 87–92, 2004.

SOSTRES, C. *et al.* Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 121–132, abr. 2010.

TAKHSHID, M. A. *et al.* The healing effect of licorice extract in acetic acid-induced ulcerative colitis in rat model. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 6, p. 1139–1144, 1 dez. 2012.

YANG, C. L. H. *et al.* Scientific basis of botanical medicine as alternative remedies for rheumatoid arthritis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 44, n. 3, p. 284–300, jun. 2013.