

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

REBEKA RAÍSA SOUZA DE MELO

**ATIVIDADE MODULADORA DO TRITERPENO PENACÍCLICO UVAOL SOBRE
MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS IN VITRO**

MACEIÓ

2013

REBEKA RAÍSA SOUZA DE MELO

**ATIVIDADE MODULADORA DO TRITERPENO PENACÍCLICO UVAOL SOBRE
MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS IN VITRO**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Salete Samaniotto

Coorientador: Prof^o Dr^o Emiliano Barreto

MACEIÓ

2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

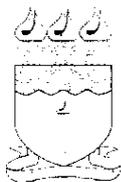
M528a Melo, Rebeka Raísa Souza de.
Atividade moduladora do triterpeno pentacíclico uvaol sobre macrófagos de camundongos in vitro / Rebeka Raísa Souza de Melo. – 2013.
76 f. : il.

Orientadora: Salete Smaniotto.
Coorientador: Emiliano Oliveira Barreto.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 65-76.

1. Macrófagos peritoneais – Viabilidade celular. 2. Matriz extracelular. 3. Uvaol – Propriedades. I. Título.

CDU: 615.275:615.322



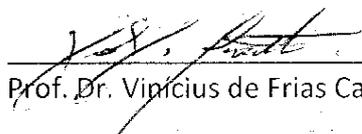
Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

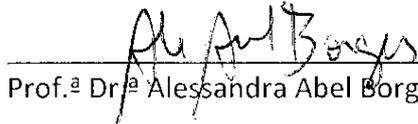
ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Defesa da Dissertação de Mestrado da mestrande Rebecka Raísa Souza de Melo, intitulada: “Atividade moduladora do triterpeno pentacíclico uvaol sobre macrófagos de camundongos in vitro”, orientada pela Prof.^a Dr.^a Salete Smaniotto, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 24 de julho de 2013.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata APROVADA.

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Vinícius de Frias Carvalho – (IOC/FIOCRUZ-RJ)


Prof.^a Dr.^a Alessandra Abel Borges - (UFAL)


Prof. Dr. Renato Santos Rodarte – (UFAL)

AGRADECIMENTOS

A *Deus* toda honra, glória e louvor. Ao meu bem maior. Aquele que me deu forças e sabedoria para alcançar todos os meus sonhos. Sem Ele nada seria. Obrigada Senhor por me amar.

Ao meu pai *Cecílio de Melo*, por ver em mim um potencial que nem eu mesmo enxergava. Por me incentivar em todos os momentos. Por cuidar de mim e por suas orações diárias. Eu sei que foram estas que me sustentaram até hoje. Eu te amo meu pai!

A minha mãe querida *Zuleide de Melo*, por me incentivar incondicionalmente e me apoiar em todas as decisões. Muito do que sou hoje devo a você. Nunca pensei que seríamos tão parecidas. Este espírito aventureiro e conquistador tenho a certeza que foi você quem me deu. Obrigada mãe.

As minhas 'mães' *Eutália de Oliveira* e *Jeronita Souza*. Sou mais que abençoada por ter a presença de vocês em minha vida. São mais que vó e tia, são colunas de sustento. Exemplos de mulheres fortes e batalhadoras como vocês, me dão forças para galgar qualquer objetivo. Obrigada por cuidar de mim.

Ao dono dos meus maiores sorrisos *Darlisson Ataíde*. Você é a maior prova de como é bom esperar em Deus. Ter você ao meu lado durante esta fase foi essencial. Teu carinho e tuas palavras doces me deram ânimo em momentos de tristeza.

A minha amiga *Éllyda Márcia*. A irmã que nunca tive que me fazer ver mais além. Ser um orgulho pra você na verdade sempre foi um imenso orgulho pra mim.

A minha querida orientadora *Prof^a Salete Smaniotto* pelo empenho, dedicação, compreensão, amizade e paciência. Mulher sábia e de postura exemplar. A senhora foi um instrumento de Deus para me ajudar nesta etapa tão importante em minha vida. Muito obrigada pela confiança a mim dedicada.

Ao meu co-orientador *Prof^o Emiliano Barreto* pela experiência e disponibilidade. Sua participação me permitiu ver a pesquisa com uma nova visão. Obrigada.

A *Prof^a Silvana Ayres*. Obrigada pela confiança de me apresentar ao universo da docência. A senhora me serviu de inspiração e me ensinou a amar e a respeitar ainda mais esta nobre profissão.

Ao meu bom e velho amigo e companheiro *Profº Altair Rogério*. Mais que amigo, um irmão e confidente. Presente na labuta diária, sua existência foi essencial para que hoje eu chegasse até aqui. Você é um presente de Deus pra mim.

A minha pequena grande amiga e companheira de mestrado *Iana Mayane*. Sempre presente e disposta a contribuir. Muitas vezes sua presença era o suficiente pra ter a certeza que tudo ia dar certo.

Aos queridos companheiros e amigos *Almair Araújo, Laís Agra, Jamylle Ferro, Rafael Vital, Maria Danielma e Marvin Paulo*. É simplesmente maravilhoso estar com vocês. Pessoas fortes e competentes que representam de forma honrosa a todos nós estudantes e pesquisadores.

As minhas queridas amigas *Larissa Vieira e Návylla Candeia*. Como diria o poeta 'amizade não se compra, se conquista' e vocês me conquistaram. É maravilhoso ter pessoas tão doces e solícitas ao meu lado. Obrigada pelo apoio e presença em todos os momentos. Eu amo vocês "peixinhas".

A todos que fazem parte da grande família do *Laboratório de Biologia Celular* um enorme 'muito obrigado' pela recepção, acolhimento, divisão de conhecimento e momentos compartilhados. Vocês possuem um lugar especial em meu coração.

Aos órgãos financiadores *CNPq, CAPES e Fapeal*.

RESUMO

Muitas substâncias oriundas de plantas têm sido usadas como moduladoras do sistema imunológico e de suas células no combate a micro-organismos e agentes estranhos. Dentre elas, pode-se destacar o triterpeno uvaol, encontrado principalmente no óleo da oliveira (*Olea europaea*). O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial efeito modulador do triterpeno pentacíclico uvaol sobre macrófagos peritoneais de camundongos *in vitro*. Os estudos foram realizados utilizando culturas de macrófagos peritoneais residentes oriundos de camundongos Swiss de 6-8 semanas. O ensaio de viabilidade celular demonstrou que o uvaol nas concentrações de 10^{-2} e 10^{-1} μM não alterou a viabilidade das células quando comparado ao controle. Resultado este confirmado pela análise microscópica dos macrófagos, os quais demonstraram uma morfologia típica para estas células. A análise por imunofluorescência demonstrou que macrófagos tratados com uvaol por 24 horas, apresentaram um aumento na produção de fibronectina e uma diminuição na produção de laminina quando comparados ao grupo controle. De forma semelhante, a análise por citometria de fluxo demonstrou que houve um aumento na expressão do receptor para fibronectina (VLA-5), ao passo que diminuiu a expressão do receptor para laminina (VLA-6). Por imunofluorescência também foram observadas alterações no citoesqueleto de F-actina das células após o tratamento com uvaol. Nos ensaios funcionais, o tratamento com uvaol estimulou positivamente a adesão dos macrófagos. Entretanto, foi observada uma diminuição da migração dessas células em câmaras de *transwell* frente ao tratamento. Demonstrou-se ainda, que o tratamento com uvaol aumentou a porcentagem de fagocitose e a capacidade fagocítica dos macrófagos quando comparados ao grupo controle. Estes resultados sugerem que o uvaol possui efeito modulador sobre os macrófagos.

Palavras chave: Macrófagos. Matriz extracelular. Uvaol.

ABSTRACT

Many substances from plants have been used as immune system modulating and his cells against microorganisms and foreign agents. Among them, the triterpene uvaol can be highlighted, found in the olive oil (*Olea europea*). The aim of this study was to evaluate the modulating effect of pentacyclic triterpene uvaol on peritoneal macrophages from mice *in vitro*. The studies were performed *in vitro* with resident peritoneal macrophages from swiss mice aged 6-8 weeks. The viability cell assay showed that uvaol 10^{-2} e 10^{-1} μ M did not affect cells viability compared to the control. This result was confirmed by microscopy analyses which showed a typical morphology for these cells. The immunofluorescence analysis showed that macrophages treated with uvaol for 24 hours revealed increased fibronectin deposition and decreased laminin deposition compared to the control group. By the same way, flow cytometry demonstrated that there was a increase expression of the fibronectin receptor (VLA-5), while decreased the expression of the laminin receptor (VLA-6). By Immunofluorescence was observed alteration in the f-actin cytoskeleton after treatment with uvaol. In the adhesion assay the treatment with uvaol positively stimulated macrophage adhesion. However, we observed a decrease in the migration of these cells in transwell chambers with treatment. The treatment with uvaol increased percentage of phagocytosis also increased phagocytic capacity by macrophages compared to the control group. The results suggest that uvaol possesses modulatory effect on macrophages.

Key-words: Macrophages. Extracellular matrix. Uvaol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático da diferenciação de macrófagos ao longo do desenvolvimento.....	17
Figura 2 – Eletromicrografia de varredura do macrófago	19
Figura 3 – Organização da matriz extracelular (MEC)	21
Figura 4 – Estrutura química do triterpeno pentacíclico uvaol.....	28
Figura 5 – <i>Olea europea</i>	30
Figura 6 – Macrófagos peritoneais residentes estimulados por zimosan A.....	36
Figura 7 – Efeito do uvaol na viabilidade de macrófagos peritoneais.....	37
Figura 8 – Análise morfológica de macrófagos peritoneais.....	38
Figura 9 – Produção de fibronectina por macrófagos peritoneais	40
Figura 10 – Produção de laminina por macrófagos peritoneais.....	41
Figura 11 – Expressão de integrinas por macrófagos peritoneais.....	43
Figura 12 – Citoesqueleto de macrófagos peritoneais	45
Figura 13 – Efeito do uvaol na adesão de macrófagos peritoneais.....	46
Figura 14 – Efeito do uvaol na migração <i>in vitro</i> de macrófagos.....	47
Figura 15 – Efeito do uvaol na fagocitose de macrófagos peritoneais	48

LISTA DE ABREVIATURAS

APC's	células apresentadoras de antígenos (antigen presenting cells)
BSA	albumina sérica bovina (bovine serum albumin)
CD49d	subunidade $\alpha 4$ da integrina
CD49e	subunidade $\alpha 5$ da integrina
CD49f	subunidade $\alpha 6$ da integrina
CTR	grupo controle
DC's	células dendríticas (dendritic cells)
DMSO	dimetilsufóxido
FITC	isotiacianato de fluoresceína (fluorescein isothiocyanate)
FN	fibronectina
GAR	anticorpos de cabra contra coelho (goat anti rabbit)
IL	interleucina
LN	laminina
MEC	matriz extracelular
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NK	natural killer
PAMP's	padrões moleculares associados aos patógenos (pathogens associated molecular patterns)
PBS	solução salina tamponada (phosphate buffered saline)
PE	ficoeritrina (phycoerythrin)
PRR's	receptores de reconhecimento de padrões (pattern recognition receptor)
RPMI	roswell park memorial institute (solução nutritiva para cultura celular)
SBF	soro bovino fetal
TLR's	receptores tipo toll (toll like receptors)
TNF	fator de necrose tumoral (tumoral necrosis factor)
VLA	antígeno de aparecimento tardio (very late antigen)
VLA-4	antígeno 4 de aparecimento tardio (very late antigen-4)
VLA-5	antígeno 5 de aparecimento tardio (very late antigen 5)
VLA-6	antígeno 6 de aparecimento tardio (very late antigen 6)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Geral	13
2.2	Específicos	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	Sistema imunológico	14
3.2	Macrófagos: aspectos gerais e funcionais	16
3.3	Matriz extracelular	20
3.4	Compostos naturais e o sistema imunológico	24
3.5	Metabólitos secundários de plantas	26
3.5.1	Triterpeno uvaol	28
4	METODOLOGIA	30
4.1	Animais	30
4.2	Cultura primária de macrófagos peritoneais residentes	30
4.3	Reagentes	31
4.4	Viabilidade celular por MTT	31
4.5	Análise morfológica	32
4.6	Ensaio de imunocitoquímica	32
4.7	Citometria de fluxo	33
4.8	Coloração direta do citoesqueleto de F-actina	33
4.9	Ensaio de adesão celular	34
4.10	Ensaio de migração celular	34
4.10	Ensaio de fagocitose	35
4.11	Análise estatística	36
5	RESULTADOS	37
5.1	Efeito do uvaol na viabilidade dos macrófagos	37
5.2	Efeito do uvaol na morfologia dos macrófagos	38
5.3	Efeito do uvaol na produção de moléculas da MEC por macrófagos	39
5.4	Efeito do uvaol na expressão de integrinas por citometria de fluxo	42
5.5	Efeito do uvaol sobre o citoesqueleto dos macrófagos	44
5.6	Efeito do uvaol na adesão celular	45
5.7	Efeito do uvaol na migração celular	46

5.8	Efeito do uvaol na atividade fagocítica de macrófagos peritoneais.....	47
6	DISCUSSÃO.....	49
7	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico, através de processos bioquímicos complexos, tem a capacidade de proteger o organismo contra agentes que possam causar danos teciduais ou doenças. Este sistema é formado por várias células e moléculas sinalizadoras responsáveis principalmente pela erradicação de patógenos invasores e outras substâncias estranhas ao organismo. A resposta imune envolve reconhecimento do material estranho e a formação de reações coordenadas para eliminá-lo, podendo ser dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa (KANJWANI et al., 2008; DUNKELBERGER; SONG, 2010).

A imunidade inata ou inespecífica está presente ao nascer e é primeira linha de defesa contra os organismos invasores. É responsável pela resposta imune inicial e possui três componentes: físico, como pele e mucosas; humorais, como o complemento e enzimas; e celulares, como os neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, células *natural killer* (NK) e macrófagos. A imunidade adquirida ou específica é obtida durante a vida do indivíduo como reação adquirida à presença de patógenos específicos (PEAKMAN; VERGANI, 1999; DUNKELBERGER; SONG, 2010; BOTTAZZI et al., 2010).

A modulação da resposta imune altera o sistema imunológico e interfere na função do mesmo, podendo apresentar como resultados a imunoestimulação ou imunossupressão (CESARO, 2009). Estudos têm sido conduzidos na busca de substâncias que possam auxiliar o sistema imune no combate a micro-organismos patogênicos e a doenças com outras etiologias (FISHER et al., 2008). Dentre as células do sistema imunológico, podemos destacar os macrófagos que participam da imunidade inata e são importantes células efetoras, conhecidos pelo seu papel crucial na fagocitose de micro-organismos (BHARGAVA; LEE, 2012).

Uma variedade de substâncias como polissacarídeos, lectinas, peptídeos, saponinas, óleos, triterpenos e outras, oriundas de plantas são capazes de estimular o sistema imune e seus diferentes tipos celulares, incluindo os macrófagos. A imunoestimulação tem a capacidade de atuar sobre as células e modular seu comportamento no meio, podendo contribuir, por exemplo, para o processo inflamatório. O alvo de nosso estudo é o triterpeno pentacíclico uvaol, um metabólito encontrado em plantas, que tem despertado interesse por possuir efeitos

terapêuticos em diversas funções biológicas, como atividade antioxidante e antitrombótica, além da atividade anti-inflamatória e anticarcinogênica (ALLOUCHE et al., 2009; ALLOUCHE et al., 2010; MARTIN et al., 2006). Entretanto, poucos estudos demonstram o efeito deste terpeno em células do sistema imunológico, e não existem relatos na literatura científica que comprovem sua atividade sobre macrófagos peritoneais. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial efeito do triterpeno pentacíclico uvaol sobre macrófagos peritoneais residentes de camundongo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o efeito do triterpeno pentacíclico uvaol sobre aspectos morfológicos e funcionais de macrófagos peritoneais de camundongos.

2.2 Específicos

- Avaliar os possíveis efeitos tóxicos do uvaol sobre os macrófagos peritoneais;
- Analisar a morfologia dos macrófagos peritoneais submetidos ao tratamento com uvaol;
- Avaliar a expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular em macrófagos peritoneais submetidos aos tratamentos com uvaol;
- Analisar o efeito do uvaol sobre a organização do citoesqueleto dos macrófagos peritoneais;
- Avaliar o potencial do uvaol na capacidade de adesão e migração de macrófagos peritoneais;
- Avaliar os efeitos do uvaol na fagocitose de macrófagos peritoneais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Sistema imunológico

O sistema imunológico é composto principalmente por células que são formadas a partir de uma *stem cell* ou célula tronco hematopoiética. Estas darão origem a todas as células sanguíneas, inclusive a si mesmas. As células tronco hematopoiéticas pluripotentes residem em nichos da medula óssea, e destas derivam o progenitor mieloide, o qual é precursor dos granulócitos, células dendríticas, monócitos, plaquetas e eritrócitos, e o progenitor linfoide o qual originará os linfócitos B, T e células NK (JANEWAY et al., 2007; PILLOZZI; BECCHETTI, 2012). O sistema imunológico é formado por várias células e moléculas sinalizadoras capazes de discriminar entre as moléculas que fazem parte do organismo (*self* = próprio) e as que não fazem parte do mesmo (*non self* = não-próprio) sendo responsável, por exemplo, pela erradicação de patógenos invasores e substâncias não próprias. Este sistema é dividido em sistema imune inato (imunidade inata) e sistema imune adaptativo (imunidade adaptativa). Desta forma, a resposta imune envolve reconhecimento do material estranho e a formação de uma reação imunológica a fim de eliminá-lo (KANJWANI et al., 2008; DUNKELBERGER; SONG, 2010; SIGALOV, 2012).

Micro-organismos que invadem o hospedeiro são reconhecidos inicialmente pelo sistema imune inato por um grupo de proteínas que funcionam como receptores de reconhecimento de padrões (PRR's). Estes receptores reconhecem na superfície dos patógenos padrões moleculares altamente conservados, os PAMP's (padrões moleculares associados ao patógeno), embora estes estejam presentes na superfície de micro-organismos patogênicos e não patogênicos (MEDZHITOV, 2007; TARR et al., 2012).

Dentre as células que fazem parte do sistema imune inato podemos destacar as células dendríticas (DC's), as células NK e os macrófagos que desempenham importantes funções. As DC's fazem parte de uma linhagem heterogênea que podem ter diversos estágios de maturação, são caracterizadas como uma das mais potentes células apresentadoras de antígenos (APC's) e representam uma população multifuncional de células com importante função na iniciação da resposta imune específica (RESCHENER et al., 2008; SCHIDMIT et al., 2012). As NK, são

conhecidas pela sua capacidade de lisar diretamente células que expressem um fenótipo de superfície celular alterado após contato com alguns patógenos como vírus, ou uma alteração maligna, ou ainda a reação de stress (BOGDAN, 2012).

O sistema imune inato fornece uma linha de defesa imediata contra infecções, desencadeando a inflamação e tendo um papel fundamental na ativação da resposta imune adaptativa. Logo, o sistema imune inato é altamente integrado com o sistema imune adaptativo (TARR et al., 2012). Ele é essencial para os recém-nascidos durante os primeiros meses de vida devido a imunidade adaptativa ainda estar em processo de desenvolvimento (TISSIERES et al., 2012).

Por outro lado, a imunidade adaptativa é iniciada quando uma resposta imune inata não é capaz de conter a infecção, tendo esta resposta como sua principal característica, a especificidade. Diferentemente do sistema imune inato, as células envolvidas no sistema imune adaptativo iniciam sua resposta após a apresentação do antígeno por uma célula apresentadora de antígeno (APC) a um linfócito patógeno-específico, pelo menos no que se refere aos linfócitos T. Este processo acontece em um órgão linfoide secundário, como por exemplo, um linfonodo, mais próximo ao sítio da infecção do patógeno (JANEWAY et al., 2007).

Os linfócitos B e T fazem parte da imunidade adaptativa. Cada linfócito é portador de receptores de superfície de uma única especificidade, deste modo o repertório total dos receptores pode reconhecer virtualmente qualquer antígeno. Quando um linfócito reconhece seu antígeno específico em um órgão linfoide secundário, esta célula passa pelo processo de expansão clonal, o qual irá gerar células efetoras e células de memórias que estarão prontas a responder ao mesmo agente em uma próxima infecção (JANEWAY et al., 2007; MESSAOUDI et al., 2011).

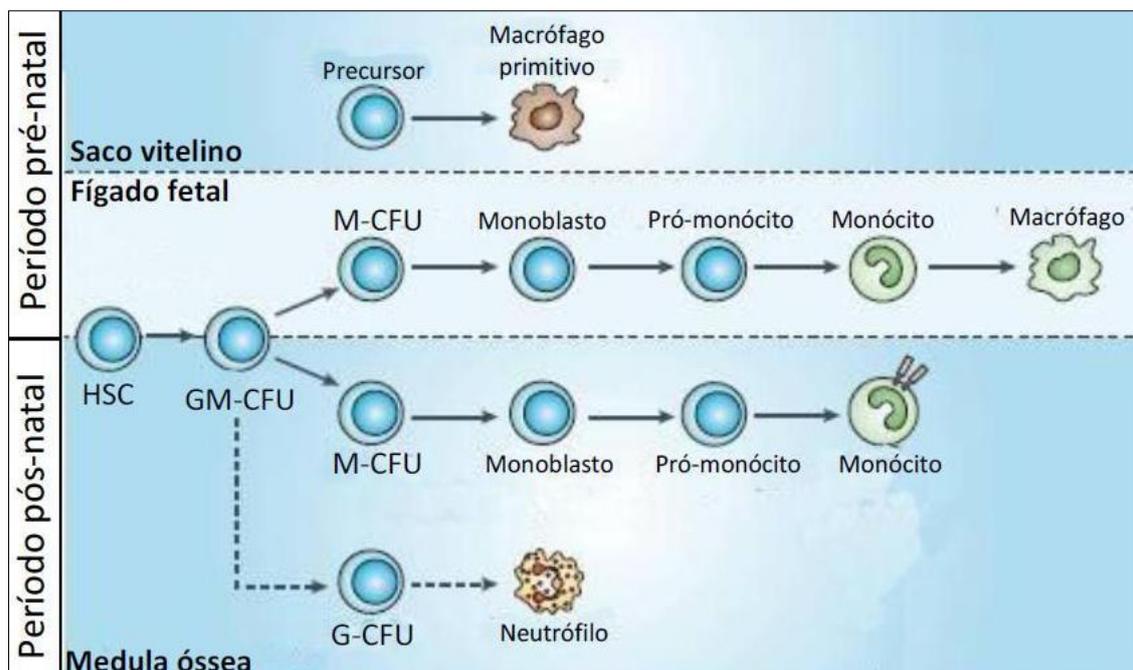
Uma variedade de substâncias e metabólitos derivados de plantas agem sobre órgãos e células do sistema imune, atuando sobre a imunidade adquirida como linfócitos, e também sobre células efetoras da imunidade inata, na qual os macrófagos surgem como importantes alvos para a ação destes produtos.

3.2 Macrófagos: aspectos gerais e funcionais

A definição de macrófago desafiou os estudiosos desde a primeira vez que ele foi descrito. Originalmente, a ênfase foi na fagocitose após observar que partículas estranhas eram ingeridas por células móveis. Estas células foram classificadas como fagócitos e dividida em dois subtipos, os macrófagos (termo de origem Grega para ‘grandes comedores’) e os micrófagos polimorfonucleares (origem Grega para ‘comedores de pequeno porte’, neutrófilos) (POLLARD, 2009). Baseados na função, morfologia, origem e na cinética destas células, em 1969 foi criada uma nova classificação para os fagócitos. Assim, foi possível classificar as células mononucleares fagocíticas e seus precursores em um sistema nomeado “sistema fagocitário mononuclear”. No qual incluiu os promonócitos e seus precursores presentes na medula óssea, os monócitos que circulam na corrente sanguínea e os macrófagos residentes nos diversos tecidos, formando assim, uma linhagem celular originada na medula óssea (VAN FURTH et al., 1972; HUME, 2006).

Inicialmente, os macrófagos são produzidos pelo saco vitelino durante o desenvolvimento embrionário, apresentando um fenótipo celular distinto das células desenvolvidas durante a idade adulta. A hematopoiese começa ainda durante a fase embrionária no fígado fetal, onde se inicia a formação de monócitos através de uma célula progenitora mieloide comum. Este processo se assemelha com o desenvolvimento dos monócitos durante a idade adulta. Durante esta fase, monócitos, assim com as outras células sanguíneas, são produzidos na medula óssea e logo após são lançados na corrente sanguínea onde circulam por vários dias até se estabelecer em um tecido (Figura 1) (VOLKMAN; GOWANS, 1965; GORDON; TAYLOR, 2005). Ao se instalar no tecido essas células maturam e se diferenciam em macrófagos. Macrófagos teciduais estão amplamente distribuídos em todo o corpo e em diferentes tecidos, podem receber nomes especiais para designar sua localização específica. No sistema nervoso central são denominados microglias, no fígado são chamados de células de Kupffer e nas vias aéreas pulmonares são chamados de macrófagos alveolares. Os macrófagos podem assumir diferentes morfologias após serem ativados por estímulos externos como micro-organismos, bem como se fundir para formar células gigantes multinucleadas (VAN FURTH et al., 1972; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Figura 1 – Desenho esquemático da diferenciação de macrófagos ao longo do desenvolvimento



Fonte: GORDON e TAYLOR (2005)

Nota: Os macrófagos são diferenciados a partir de monócitos produzidos em sítios hematopoiéticos que variam de acordo com o desenvolvimento do organismo. No adulto, os monócitos são produzidos na medula óssea e compartilham o mesmo precursor com os neutrófilos. HSC: célula-tronco hematopoiética, GM-CFU: unidade formadora de colônia granulócito-macrófago, G-CFU: unidade formadora de colônia de granulócito, M-CFU: unidade formadora de colônia de macrófago.

A morfologia do macrófago pode depender do órgão, tecido ou até mesmo do seu estado de ativação. Entretanto, em um animal saudável, as características morfológicas destas células são comuns. Macrófagos teciduais são células grandes de 10 a 25 μm de diâmetro, irregulares, com citoplasma basófilo, repleto de vacúolos pequenos e grânulos também pequenos e densos; o núcleo em forma de rim ou oval, excêntrico, em geral, não apresenta nucléolos (VAN FURTH et al., 1972). Os macrófagos possuem uma grande heterogeneidade, dependendo do seu estágio de diferenciação e de sua resposta a uma vasta rede de sinais que lhes podem ser enviada (GORDON; TAYLOR, 2005).

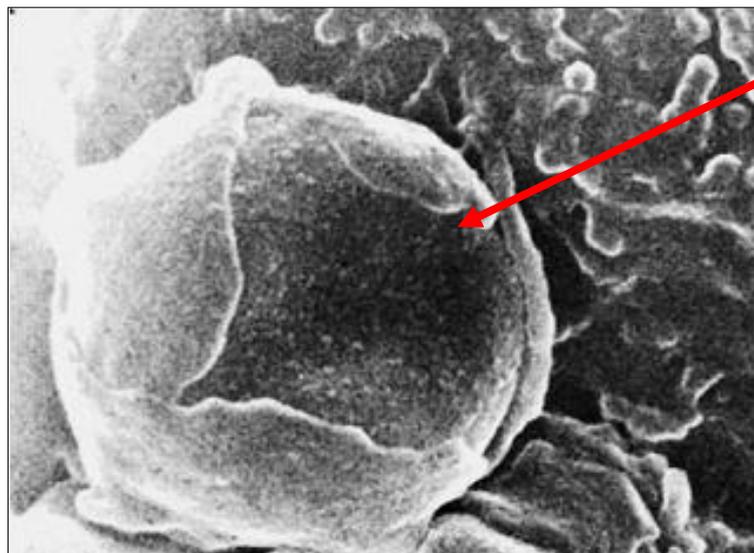
Estudos sobre a expressão de antígenos de diferenciação e de receptores de superfície demonstram que macrófagos teciduais tornam-se marcadamente heterogêneos e expressam fenótipos diferentes, refletindo as especializações de funções da célula dentro do microambiente específico (TAYLOR et al., 2005). Dentre as diversas classes de famílias moleculares encontradas na superfície do macrófago, podemos citar as integrinas, a superfamília das imunoglobulinas (Ig's),

receptores de quimiocinas dentre outros (TAYLOR et al., 2005; POLLARD, 2009). Sendo uma das principais células da imunidade inata, os macrófagos também expressam em sua superfície altos níveis de receptores de reconhecimento de padrões (PRR's) incluindo receptores scavengers, receptores específicos de β -glucan (Dectin-1) e receptores tipo toll (TLR's), que ao entrar em contato com o micro-organismo e após ligação com os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP's) presentes na superfície dos mesmos, transmitem sinais por meio de seletivas moléculas, e desencadeia uma série de respostas imunológicas (TAYLOR et al., 2005).

Independente de estímulo inflamatório ou não, monócitos circulantes são recrutados aos tecidos, tornando-se macrófagos teciduais residentes. Este processo envolve mecanismos moleculares, como a participação da quimiocina CXCL14 e o envolvimento de células, como as células endoteliais. Outras moléculas, as selectinas, por exemplo, são proteínas de superfície que interagem com ligantes de glicoproteínas, permitindo desta forma que os precursores de macrófagos se liguem mais fortemente às células endoteliais e inicie a cascata de adesão. Além disso, as integrinas β 1 e β 2 presentes na superfície dos monócitos proporciona a adesão firme dessas células nas paredes do endotélio vascular. Desta forma, a ativação das integrinas medeia os processos de adesão e migração celular (ANCUTA et al., 2003; IMHOF; AURRAND-LIONS, 2004).

Macrófagos também são reconhecidos por seu importante papel na fagocitose de micro-organismos. A fagocitose é um processo no qual macrófagos, células dendríticas e outros fagócitos mieloides internalizam partículas alvo, formando fagolisossomos, que é um compartimento ácido, no qual o micro-organismo é morto e digerido em pequenas partículas em preparação para a apresentação do antígeno (Figura 2) (ADEREM, 2003).

Figura 2 – Eletromicrografia de varredura do macrófago



Fonte: GORDON (2007)

Nota: Demonstração da extensão de pseudópodes do macrófagos durante o englobamento de um eritrócito de ovelha.

Nos tecidos onde são encontrados, os macrófagos possuem a capacidade de responder a estímulos metabólicos e produzir mediadores pro-inflamatórios e/ou anti-inflamatórios (BARGHAVA; LEE, 2012). Durante processos inflamatórios, após estimulação por micro-organismos, produtos microbianos ou por fatores endógenos, incluindo as citocinas, os macrófagos podem sintetizar e liberar uma grande quantidade dessas substâncias, incluindo fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-6 (IL-6), IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12. Algumas citocinas, como a IL-3, podem regular e estimular a produção de citocinas pelos macrófagos, enquanto outras como a IL-4, IL-10 e a IL-13 têm a capacidade de inibir essa síntese (ZIMMERMANN et al., 2012; CAVAILLON, 1994).

Os macrófagos desempenham papéis cruciais no desenvolvimento de muitos tecidos, além do envolvimento em quase todas as doenças devido a sua função imunológica e sua ação no processo de cicatrização. Além disso, desempenham uma importante função homeostática na remoção de células senescentes, na remodelação do tecido e reparo após lesão ou infecção tecidual (POLLARD, 2009). No reparo ao tecido lesado, os macrófagos secretam diferentes citocinas e fatores de crescimento que ajudam na remodelação da matriz extracelular e no recrutamento de células estruturais como fibroblastos e células do músculo liso (LUCAS; GREAVES, 2001). Além disso, também produzem e secretam moléculas de matriz extracelular como colágeno, fibronectina e laminina (JOHANSSON et al.,

1979; ALITALO et al., 1980; VAAGE; LINDBLAD, 1990; PEDRAZA et al., 2000). Estudos têm demonstrado que a laminina interfere na adesão, fagocitose, citotoxicidade e na migração de macrófagos; e é expressa na superfície de macrófagos murinos ativados (PEDRAZA et al., 2000). Enquanto que a fibronectina é capaz de estimular a produção do fator de crescimento celular, aumenta a expressão de receptores Fc e formam uma cobertura sobre restos celulares, facilitando a fagocitose (MOSHER, 1984).

3.3 Matriz extracelular

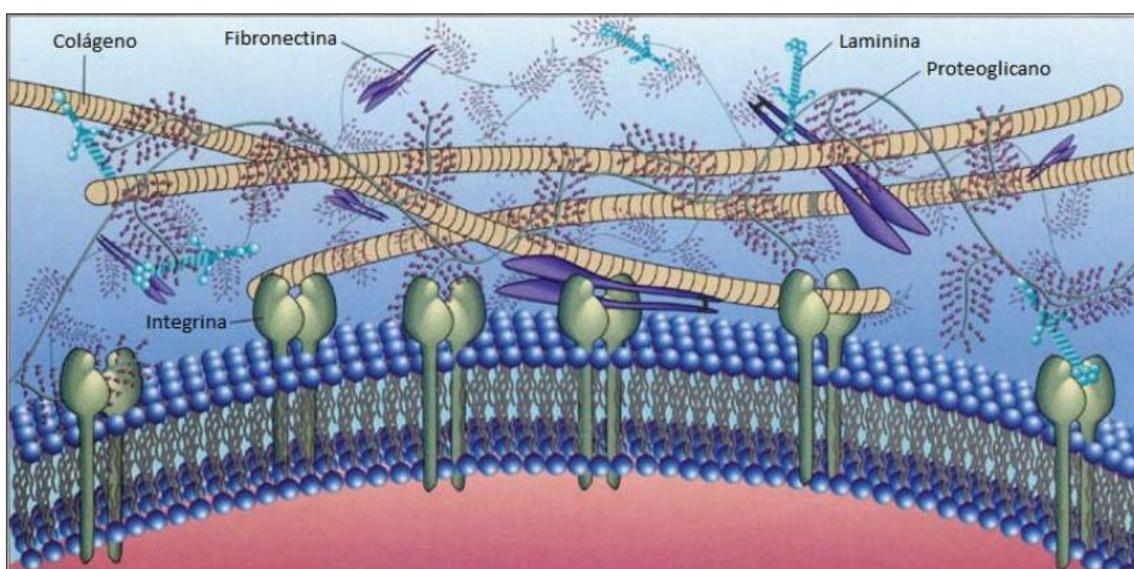
A matriz extracelular (MEC) é constituída por uma complexa rede estrutural de moléculas que preenche os espaços intercelulares na constituição dos tecidos que, em sua grande maioria são secretadas localmente. Nos organismos multicelulares, é fundamental a integração adequada dos seus constituintes, dentre eles as células e a matriz extracelular que apresentam grande atividade de ligação entre si e com receptores expressos na superfície celular, dos quais as integrinas constituem a classe mais importante (Figura 3) (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003). Após décadas de estudos sobre a matriz extracelular foram identificadas inúmeras moléculas, de diversas isoformas, que fazem parte de tecidos específicos cujas células possuem receptores específicos para estas moléculas. Desta forma, componentes da MEC podem regular eventos celulares similarmente aos fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, hormônios dentre outros, além de influenciar na adesão, migração, proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares (VON DER MARK et al., 1992; CHAGNOT et al., 2012).

A maioria das MEC's é constituída por proteínas fibrosas tais como, os colágenos e a elastina, juntamente com glicoproteínas, proteoglicans e ácido hialurônico. A MEC apresenta uma estrutura dinâmica que sofre remodelação constante em que implica o envolvimento das metaloproteases, isto ocorre não só no desenvolvimento normal, como também em vários processos patológicos (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003).

Dentre os componentes da MEC podemos destacar as glicoproteínas, laminina e fibronectina, e seus receptores integrinas (Figura 3). A fibronectina é uma glicoproteína que pode ser encontrada em superfícies celulares, no plasma, ou na matriz extracelular. Ela pode ser sintetizada por diversos tipos celulares, incluindo

células hepáticas, células endoteliais, fibroblastos e também por macrófagos (SINKIN et al., 1998; AZIZ-SEIBLE; CASEY, 2011). É uma glicoproteína formada por um dímero constituída por duas subunidades similares, embora não idênticas, são unidas por duas pontes dissulfídicas localizadas próxima à região carboxi terminal. Cada cadeia polipeptídica da fibronectina é constituída de uma série de domínios estruturais e funcionais, contendo a molécula pelo menos seis sítios peptídicos capazes de promover adesão celular (SINGH et al., 2010).

Figura 3 - Organização da matriz extracelular (MEC)



Fonte: biocelmembrana.blogspot.com

Nota: A MEC é formada por várias proteínas e polissacarídeos, organizados de maneira a formar uma rede complexa, fundamental para a manutenção tecidual e a interação célula-célula e célula-MEC.

Entre as atividades biológicas da fibronectina está seu envolvimento na adesão, migração, proliferação, forma, crescimento e diferenciação celular (HYNES; YAMADA, 1982). Neste sentido estudos mostram que tratamento com fibronectina celular purificada pode restaurar a forma celular normal, a organização dos microfilamentos de actina, a adesividade e migração de células, originalmente deficientes de fibronectina (HYNES; YAMADA, 1982; YAMADA, 2000). Ainda, células precursoras de macrófagos, após estimulação com as citocinas IL-1 α , IL-6 e TNF- α , produzem fibronectina como resultado desta ativação (KITAMURA et al., 2000).

A laminina, outro componente glicoproteico da MEC, pertence a uma família de proteínas heterotriméticas, constituídas pela associação de 3 produtos de genes

diferentes, os quais codificam as cadeias α , β , e γ (AUMAILLEY; SMYTH, 1998). Esta glicoproteína é o principal componente não colagenoso de membrana basal e pelo menos 16 isoformas de lamininas já foram identificados, cada uma com diferentes padrões de expressão espaço-temporais, funções e localização (PATARROYO et al., 2002). Diferentes isoformas de laminina são sintetizadas por muitos tipos celulares, incluindo células epiteliais, musculares e macrófagos (PEDRAZA et al., 2000). A laminina desempenha um papel essencial na formação da membrana basal devido às múltiplas interações com os constituintes da membrana e com ela mesma (AUMAILLEY; SMYTH, 1998). Além disso, a laminina tem função estrutural, adesiva, de sinalização celular e é capaz de modular o comportamento celular incluindo diferenciação e migração celular, através da interação com receptores de superfície celular, as integrinas (PEDRAZA et al., 2000).

As integrinas são proteínas transmembranares heterodiméricas expressas em todas as células nucleadas (BERTON; LOWELL, 1999). Em vertebrados a família das integrinas é composta por 18 subunidades α e 8 subunidades β , as quais podem emparelhar-se em várias combinações de uma cadeia α e uma cadeia β não covalentemente associadas. Reconhecimento baseado pela interação célula-MEC, as integrinas medeiam ligação com a laminina através das cadeias $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e principalmente pela $\alpha 6\beta 1$ (VLA-6;CD49f) (SHIMIDT; FRIEDL, 2010). A ligação à fibronectina dar-se principalmente através das integrinas $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4;CD49d) e $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5;CD49e) (BERTON; LOWELL, 1999).

As subunidades extracelulares das integrinas contêm regiões de interações aos ligantes, sendo o domínio citoplasmático relativamente pequeno e contém regiões capazes de se ligar internamente a elementos do citoesqueleto, estrutura a qual é formada por filamentos e microtúbulos, que em conjunto mantém a forma da célula e organiza o espaço intracelular (RIDLEY et al., 2003; IMHOF; AURRAND-LIONS, 2004). Após a ligação externa da integrina a sua glicoproteína específica sinais intracelulares ao citoesqueleto de actina são desencadeados formando-se então pontos de conexão entre e as integrinas e a actina, denominados sítios de adesão focal. Os filamentos de actina ligam-se a subunidade β do domínio citoplasmático das integrinas e assim transmitem sinais para organização do citoesqueleto e regulam com isso, a forma e a arquitetura celular (POZZI; ZENT, 2003; GEIGER et al., 2009). Ainda, as integrinas funcionam como receptores

bidirecionais, ou seja, as informações intracelulares são capazes de controlar a função destas glicoproteínas. E a ligação integrina/MEC é capaz de interferir diretamente nas funções biológicas, tais como, adesão e migração celular (DALON; BROWN, 2007; POZZI; ZENT, 2003).

A permanência da célula num tecido, ou a sua migração, depende da natureza do substrato e pode ser regulada através do contato da integrina à matriz. Por sua vez, o processo de migração celular envolve a participação de diversos receptores, dentre os quais as integrinas são a maior família de receptores envolvidos. Durante a migração ocorre a polarização do corpo celular, contribuindo para a formação de projeções citoplasmáticas como os filopódios e lamelipódios, formação de novos complexos de adesão focal e a retração da cauda interferindo assim no citoesqueleto celular (RIDLEY et al., 2003; IMHOF; AURRAND-LIONS, 2004).

A produção de glicoproteínas da MEC e a expressão dos seus receptores por diversas células, bem como os processos de adesão, deadesão e migração podem influenciar na fisiopatologia de diversas doenças. Por exemplo, a aterosclerose pode ter seu desenvolvimento modulado por células, tais como os macrófagos, que estão entre os principais tipos celulares envolvidos na progressão da doença. Ao longo dos anos, estudos demonstraram que macrófagos são recrutados para o local da lesão, onde liberam citocinas, quimiocinas e produzem enzimas proteolíticas de matriz extracelular, como as metaloproteinases, que são capazes de degradar a matriz e promover a migração celular. Assim, essas células podem ser cruciais na reparação tecidual, na progressão da placa e ruptura da mesma (ANITSCHKOW, 1960; ROSS, 1999; SAHA et al., 2009).

A fibronectina é capaz de interferir na resposta inflamatória modulando a liberação de mediadores inflamatórios como as citocinas TNF- α , IL-1 β , e IL-8, pelos macrófagos (FEGHALI; GRENIER, 2012). Desta forma, a manutenção da interação entre macrófagos e componentes da matriz extracelular é importante para a homeostase do organismo, bem como na prevenção e desenvolvimento de patologias.

3.4 Compostos naturais e o sistema imunológico

O uso de produtos naturais no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à história humana. A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Entretanto, é o reino vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituíram modelos para a síntese de um grande número de fármacos (VARANDA, 2006). A variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teriam-se formado e evoluído, como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação. Desta forma, as plantas constituem-se num enorme laboratório da síntese orgânica de metabólitos secundários (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Neste contexto, muitas plantas e outros produtos de origem natural têm sido estudados com o objetivo de descobrir seus possíveis efeitos no organismo, como também para a descoberta de novos fármacos. Vários trabalhos demonstram importantes resultados acerca da utilização de produtos naturais em diferentes patologias. Dentre estes podemos citar o extrato etanólico extraído a partir das fibras da casca do coco (*Cocos nucifera* L.) que demonstrou um potencial efeito antioxidante, sendo então seu uso importante para uma dieta saudável, bem como no mercado farmacêutico (DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2013). Ainda, o extrato etanólico da Edelweiss, uma planta empregada na medicina popular como um remédio anti-inflamatório, teve seu potencial efeito anti-inflamatório confirmado (DANIELLA et al., 2012). Além destes, alguns estudos ainda revelam efeitos de extratos de plantas na regulação do sistema vascular. O extrato aquoso da espécie *Gardenia jasminoides* J. Ellis, uma espécie arbórea distribuída em todo o mundo, demonstrou uma notável atividade antitrombótica, suportando seu possível uso como terapia antitrombótica (ZHANG et al., 2012). Ivanov e colaboradores (2007) demonstraram que um mix de micronutrientes, incluindo extrato da folha de chá verde e o extrato de centelha asiática, utilizado como indutor da produção de moléculas da MEC por células endoteliais aórticas, causou mudanças na

composição da MEC e uma conseqüente diminuição na capacidade adesiva de macrófagos. Alterações na composição da MEC pode afetar o recrutamento de células, tais como os macrófagos, que participam de processos inflamatórios vasculares, como por exemplo, a aterosclerose.

Estudos vêm demonstrando que a utilização de plantas pode, de forma alternativa, estimular células e atuar no tratamento de doenças (CORRÊA et al., 2006). No entanto, o uso inadequado e indiscriminado dessas substâncias podem gerar complicações clínicas por causa de efeitos adversos retardados, interações medicamentosas ainda não estudadas, além de retardar o diagnóstico apropriado (RATES, 2001). Neste sentido, tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; BOURSUK et al., 2011; DOS SANTOS OLIVEIRA et al., 2013).

O sistema imunológico, por ser um dos principais eixos homeostáticos dos vertebrados, sendo este capaz de reconhecer e responder as alterações nos meios interno e externo, tem sido alvo de muitas pesquisas. Nos últimos anos, muitos estudos têm sido realizados na busca de novas moléculas bioativas, que tenham ação no sistema imunológico e que possam auxiliar no combate a micro-organismos patogênicos e a doenças com outras etiologias (FISCHER, 2008).

A *Aloe vera* é um exemplo da utilização de compostos naturais na indústria farmacêutica atual. A mesma tem sido utilizada por diversos séculos devido as suas propriedades curativa e terapêutica. Assim, seu uso na forma de gel, unguentos, bem como na preparação de comprimidos e capsulas tem sido bastante difundido (HAMMAN, 2008).

A capacidade de controlar a resposta é o objetivo da imunomodulação, e substâncias que exercem este controle são chamadas de imunomoduladores (FRAILE et al., 2012). A imunomodulação é uma necessidade terapêutica para o terceiro milênio e está ainda na sua infância (LABRO, 2000). A modulação da resposta imune altera o sistema imunológico e interfere na função do mesmo, podendo apresentar como resultados a imunoestimulação ou imunossupressão (CESARO, 2009).

Uma variedade de substâncias como polissacarídeos, lectinas, peptídeos, saponinas, óleos e outras, oriundas de plantas são capazes de estimular o sistema imune, apresentando atividade imunomoduladora. Entretanto, o funcionamento do

sistema imunológico e o desconhecimento de mecanismos de ação específicos destes agentes e de seus efeitos adversos dificultam seu uso clínico como imunomoduladores.

3.5 Metabólitos secundários de plantas

A dieta humana é bastante rica em alimentos que possuem componentes com alta atividade biológica. Dentre esses as lectinas, que são proteínas ou glicoproteínas que se ligam à estruturas de carboidratos, possuem potentes atividades biológicas e são encontradas em uma vasta gama de alimentos, incluindo verduras, legumes, frutas e até mesmo em alimentos processados (NACHBAR; OPPENHEIM, 1980; KELSALL et al., 2002). As lectinas exibem atividades seletiva e reversível, e tornaram-se dessa forma cada vez mais conhecidas como mediadores celulares de reconhecimento de uma grande variedade de sistemas biológicos (PEREIRA DA SILVA et al., 2012). Lectinas oriundas de algas tem sido alvo de estudos como potentes candidatos a atividade antiviral, principalmente contra o HIV, sendo desta forma uma nova estratégia para diminuir a disseminação do agente causador da AIDS (Acquired immune deficiency syndrome) (HUSKENS; SCHOLS, 2012).

Nos últimos anos significantes avanços têm sido alcançados no que se refere à regulação, à biossíntese e a manipulação genética de produtos naturais. A manipulação na biossíntese de flavonoides tem sido bastante estudada, incluindo a modificação da expressão de genes de regulação e a manipulação das vias de alguns genes. Os flavonoides são conhecidos por serem derivados de produtos naturais e por sua função como pigmento floral para a atração de insetos polinizadores e na defesa contra micro-organismos em plantas (DIXON; STEELE, 1999). Em humanos, este metabólito tem demonstrado atividade anticancerígena através dos mesmos mecanismos de ação ou de mecanismos distintos de drogas anticancerígenas já existentes (AUYEUNG; KO, 2010). Além disso, flavonoides podem prevenir a aterosclerose através do melhoramento da dislipidemia, diminuição do stress oxidativo, atenuação da inflamação, melhorando assim o metabolismo do indivíduo e diminuindo o risco de doenças cardiovasculares (MULVIHILL; HUFF, 2012).

Outro grupo de substâncias isoladas bastante estudado nas últimas décadas é o grupo das saponinas. Esta classe pode ser dividida em saponinas esteroidais e saponinas triterpênicas, ambas comumente encontradas em grande escala em plantas e produtos derivados de plantas. A estrutura química das saponinas consiste em uma parte de açúcar, geralmente glicose, galactose, ácido glicurônico, xilose (porção hidrofílica) ligados a aglicona (porção lipofílica), podendo ser um esteroide ou um triterpenóide (FRANCIS et al., 2002).

As saponinas esteroidais são surfactantes e detergentes naturais, e têm sido consideradas como fator responsável por diversas atividades biológicas. Estudos que esclareçam suas possíveis atividades ou mecanismos de ação, bem como a descoberta de novas substâncias que se enquadram nesta classe, estão em constante pesquisa (WILLIAMS; GONG, 2007; DINCHEV et al., 2008; LIU et al., 2012). Achados recentes demonstram a descoberta de saponinas nunca antes catalogadas (HONG et al., 2012), enquanto outros confirmam a presença de saponinas esteroidais em estruturas de plantas que ainda não tinham sido determinadas (SHARMA et al., 2012). Juntamente com o avanço da descoberta dessas estruturas vem ocorrendo o aumento de pesquisas voltadas as suas atividades e possíveis mecanismos de ação. Qin e colaboradores (2012) isolaram saponinas das raízes da planta *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, uma planta de uso popular na medicina chinesa, e confirmaram o efeito antimicrobiano destes isolados contra a bactéria causadora da acne *Propionibacterium acnes*.

Por outro lado, as saponinas triterpênicas diferem das saponinas esteróidais. Os triterpenóides recebem essa classificação devido a sua composição estrutural, por conter seis unidades isoprenos e possuindo 30 unidades de carbono. De acordo com os diferentes tipos de rearranjo estrutural, pode originar os triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos. A biossíntese das saponinas triterpênicas envolve três enzimas principais: oxidoesqualeno ciclase, essa tem a função de construir o esqueleto base dos triterpenos; a monooxigenase citocromo P450, que media as oxidações; e uridina-difosfato-glicosiltransferase-dependente, a qual catalisa as glicosilações (SAWAI; SAITO, 2011).

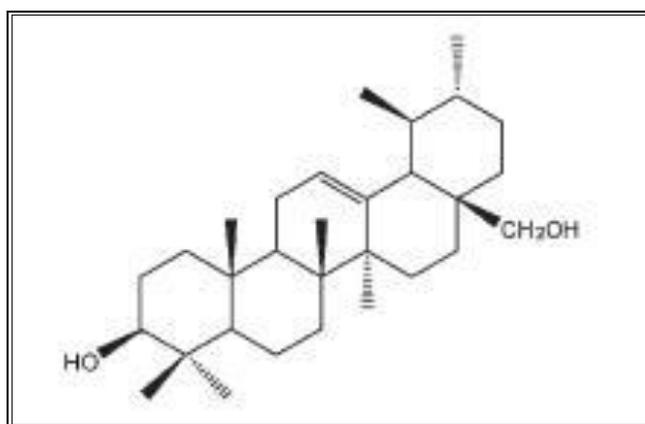
Os triterpenos são divididos em vários grupos os quais podemos citar: esqualeno, lanostano, damarrano, lupanos, eleonanos, ursanos, hopanos e miscelaneos que desempenham diferentes papéis e diferem principalmente em suas estruturas (HILL; CANNOLY, 2012).

3.5.1 Triterpeno uvaol

O terpeno uvaol é classificado como um triterpeno pentacíclico pertencente à classe dos ursanos (Figura 4). Este terpeno é bastante difundido na natureza e sua presença já foi confirmada em diversas plantas (DUQUESNOY et al., 2007). Dentre elas a planta *Carpobrotus edulis* (MARTINS et al., 2011), nas frutas e folhas da planta *Vaccinium vitis-idaea* L. (SZAKIEL et al., 2012) e foi isolado pela primeira vez por Huang e colaboradores (2011) na planta *Coleus forskohlii*. Ainda, pode-se destacar a presença do uvaol na planta *Olea europaea* L., popularmente conhecida como oliveira, árvore esta que produz a matéria base para a extração do azeite de oliva (ALLOUCHE et al., 2009) (Figura 5).

O uvaol, assim como outros triterpenóides, é encontrado principalmente nas folhas (DUQUESNOY et al., 2007; GUINDA et al., 2010) da oliveira. Contudo, sua presença em outros segmentos da planta já foi demonstrada, como na casca (CAPUTO et al., 1974), no caroço da oliva (ALLOUCHE et al., 2009), e independente do estágio do desenvolvimento, os triterpenos, dentre eles o uvaol, são os maiores componentes do fruto da oliveira (STITI et al., 2007).

Figura 4 - Estrutura química do triterpeno pentacíclico uvaol



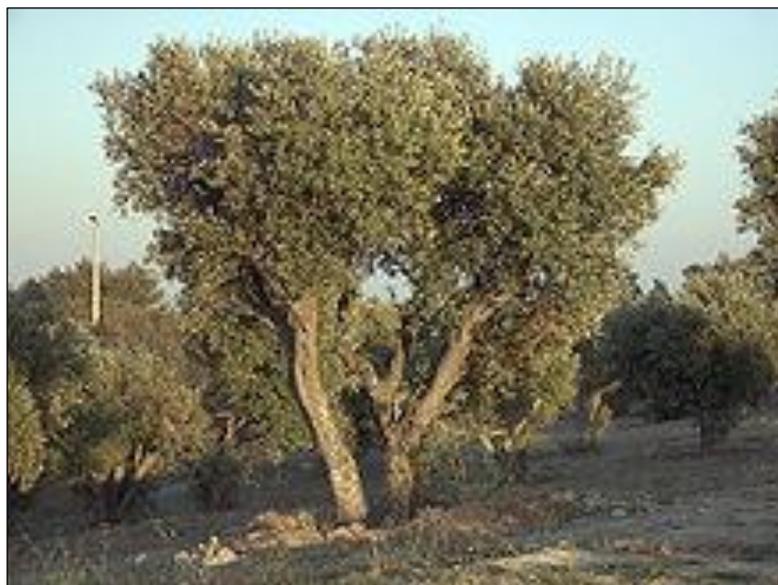
Fonte: GUINDA et al., 2010; MARTIN et al., 2006.

O triterpeno pentacíclico uvaol é formado por 6 unidades isoprenos, que são constituídas por 30 moléculas de carbono (C_5). Uvaol possui um radical hidroxila na posição C-3 de sua estrutura química e uma função carboxila na posição C-17.

Estudos têm demonstrado a participação do triterpeno uvaol em diversas atividades biológicas, como atividade antimicrobiana (HORIUCHI et al., 2007), antioxidante e antitrombótica (ALLOUCHE et al., 2010) e anticarcinogênica, pela indução da apoptose de células malignas cerebrais (MARTIN et al., 2009). Da Silva

Filho e colaboradores (2009) demonstraram um grande potencial antiparasitário do triterpeno uvaol. Estudos *in vitro* por esses autores mostraram que o uvaol extraído da planta *Baccharis dracunculifolia* teve efeito antileishmanial contra a espécie *Leishmania donovani* e antiplasmodial contra *Plasmodium falciparum*, ambas as espécies causadoras de parasitoses encontradas no Brasil, e que podem levar a morte. Além disso, Martin e colaboradores (2006) demonstraram que o uvaol possui atividade moduladora em células mononucleadas de sangue humano. Observou-se que após tratamento, as células diminuíram significativamente a produção das citocinas, IL-1 β e IL-6 de maneira dose-dependente. Similarmente, em doses mais elevadas, observou-se também a diminuição da produção de TNF- α . Contudo, em dose menor a produção de TNF- α pelas células foi aumentada. Demonstrando assim que o triterpeno exibe atividade pró-inflamatória e anti-inflamatória dependendo, neste caso, da dose administrada.

Figura 5 - *Olea europaea*



Fonte: <http://www.online-utility.org/image/gallery.jsp?title=Olea+europaea>

Tomando em conjunto, os estudos apontam a capacidade de diversas plantas, assim como seus componentes isolados de mediar ou modular respostas biológicas, sendo desta forma, importantes objetos de estudo como potenciais agentes auxiliares na terapêutica atual. Assim sendo, o presente estudo procurou investigar as possíveis ações moduladoras do triterpeno uvaol sobre os macrófagos, uma importante célula envolvida na resposta imunológica e na homeostase tecidual.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos, adultos, de 4-8 semanas, da linhagem *Swiss* provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular em ciclo claro/escuro 12/12h, com livre acesso a ração e água. Todos os procedimentos foram realizados mediante aprovação do Comitê de Ética Institucional da UFAL (Processo nº: 010095/2009-67).

4.2 Cultura primária de macrófagos peritoneais residentes

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, lavados com álcool a 70% e, na cabine de fluxo laminar foram afixados a um suporte de isopor para a abertura da parede abdominal e remoção da pele da região ventral. Com o auxílio de uma seringa descartável, 10 mL de meio RPMI 1640 foi injetado na cavidade peritoneal cuidadosamente para não atingir órgãos do animal. Após leves batidas para agitar o líquido dentro da cavidade, foi feita a coleta do meio contendo as células, que foi transferido para um tubo de 15 mL e centrifugado a 4 °C por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* contendo as células foi ressuscitado em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 1% do aminoácido L- glutamina e 2mg/mL do antibiótico ciprofloxacino para posterior contagem em câmara de Neubauer. As células então foram plaqueadas, colocadas em estufa de CO₂ para adesão durante 2h e, desaderidas utilizando *cell screaper* para posterior utilização de acordo com os protocolos experimentais desejados.

Essa é uma técnica simples que permite o isolamento de macrófagos peritoneais, uma vez que essas células possuem a propriedade de aderir ao plástico e ao vidro.

4.3 Reagentes

Os reagentes uvaol, prometazina dimetilsulfóxido (DMSO), MTT, soro bovino fetal (SBF), *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), azul de Tripán, solução de salina fosfatada (PBS), zimosan A (*Saccharomyces cerevisiae*), aminoácido L-glutamina não animal, albumina sérica bovina (BSA) e fibronectina celular foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA). Tween foi obtido da AMRESCO (Solon, Ohio, EUA), a laminina foi obtida da Invitrogen (São Paulo, Brasil) e o antibiótico ciprofloxacino da Isofarma LTDA (Ceará, Brasil).

Para os ensaios de imunofluorescência foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-fibronectina e anti-laminina de camundongo produzidos em coelho e anti-Ig de coelho produzido em cabra conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (GAR-FITC) obtidos da Sigma-Adrich (St. Louis, MO, EUA). Para as análises citofluorimétricas foram utilizados anticorpos específicos conjugados a fluorocromos: anti-CD49e/ficoeritrina (PE) produzido em rato, obtido da BD Pharmingen (San 33 Diego, CA, EUA), anti-CD49f/ficoeritrina (PE), e o isotipo controles IgG2a produzido em rato, controle negativo dos anticorpos conjugados a PE foi produzido pela eBioscience (San Diego, CA, EUA).

4.4 Viabilidade celular por MTT

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pela análise de redução de MTT. Neste ensaio observa-se quantitativamente a viabilidade celular através da redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] na mitocôndria de células viáveis. Em uma placa de 24 poços foram cultivados $2,5 \times 10^5$ macrófagos peritoneais por poço durante 24 horas em estufa de CO₂ e 37°C. Foram utilizados como controles do experimento RPMI suplementado e tween 3% (controle de morte celular). As células foram tratadas com uvaol por 24 horas nas concentrações de 10^{-3} µM, 10^{-2} µM, 10^{-1} µM, 1 µM, 10 µM e 10^2 µM. Macrófagos não tratados, submetidos as mesmas condições de umidade e temperatura foram utilizados como controle dos experimentos. Em seguida, um volume de 22,5 µL da solução de MTT (5mg/mL) foi adicionado a cada poço e a placa foi novamente encubada em estufa de CO₂ por mais 4 horas. Em seguida, a placa foi centrifugada por 5 minutos (1500

rpm), o sobrenadante foi desprezado e adicionado a cada poço 150 μL de DMSO seguido da leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm.

4.5 Análise morfológica

Este ensaio teve o objetivo de avaliar a morfologia dos macrófagos peritoneais após tratamento com uvaol nas concentrações de 10^{-2} μM e 10^{-1} μM . Para isso, 2×10^5 macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços contendo lamínula de vidro por 2 horas em estufa de CO_2 a 37°C . Após esse período, os poços foram lavados 2 vezes com PBS em temperatura ambiente para a retirada de células não aderentes. Após o tratamento com uvaol por 24 horas, as células foram lavadas, fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com Giemsa por 8 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram removidas, montadas em lâminas permanentes e analisadas por microscopia de luz. As fotos foram obtidas através da câmara Nikon modelo DS-Ri1 campo claro acoplada ao Microscópio Nikon Eclipse 50i. Nas células, foram observados aspectos morfológicos como: forma das células e do núcleo, relação núcleo x citoplasma, presença de vacúolos e emissão de prolongamentos citoplasmáticos.

4.6 Ensaio de imunocitoquímica

Macrófagos peritoneais foram cultivados em placas de 8 poços (Lab-tek, Nunc, EUA), com lâminas de vidro, num volume total ajustado para 1×10^5 células por poço. Após 2 horas as células foram tratadas com o triterpeno uvaol nas concentrações de 10^{-2} μM e 10^{-1} μM e submetidas ao ensaio de imunofluorescência indireta. Inicialmente os macrófagos foram lavados com PBS e fixados em metanol puro por 10 minutos, hidratados com 100 μL de PBS por 5 minutos e feito o bloqueio para sítios inespecíficos com uma solução de PBS/BSA a 1% durante 30 minutos. Em seguida, foi adicionado a cada poço o anticorpo primário específicos para fibronectina (1:50) e para laminina (1:50), por 1 hora, a temperatura ambiente, com exceção do grupo controle que recebeu apenas PBS. Passado este período, as células foram lavados com PBS (três banhos de 5 minutos) e marcados com o anticorpo secundário, GAR-FITC (1:100), por 30 minutos em câmara escura. As células foram lavadas 2 vezes com PBS e montadas com glicerol para posterior

observação em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i. A análise da deposição de fibronectina e laminina foi baseada na avaliação qualitativa da intensidade de fluorescência observada na superfície das células. A intensidade de fluorescência foi determinada em pixels e quantificada pelo programa Image J 1.44p.

4.7 Citometria de fluxo

Para avaliar a expressão das integrinas na superfície dos macrófagos foi realizado o ensaio de citometria de fluxo. Os macrófagos peritoneais foram acondicionados em frascos de cultura, submetidos ao tratamento com uvaol nas concentrações de 10^{-2} μM e 10^{-1} μM durante 24 horas em estufa de CO_2 a 37°C . Após o tratamento as células foram removidas dos frascos utilizando cell scrapers, centrifugadas e ressuspendidas em meio RPMI. Um volume total ajustado para 5×10^4 célula foi plaqueado em placas de 96 poços e realizada as marcações com anticorpos específicos conjugados a fluorocromos. Foi utilizada marcação durante 20 minutos com anticorpos para as cadeias alfa das integrinas VLA-5 (anti-CD49e/PE) e VLA-6 (anti-CD49f/PE) diluídos em PBS e mantidos ao abrigo da luz a 4°C . Transcorrido o tempo da marcação, as células foram lavadas com PBS e fixadas em formaldeído a 2% para análise em citômetro de fluxo (FACS canto II). As células marcadas então foram analisadas através do Software Win MDI 2.8.

4.8 Coloração direta do citoesqueleto de F-actina

Para avaliar os microfilamentos do citoesqueleto, macrófagos peritoneais (1×10^5 células por poço) foram submetidos ao tratamento com uvaol nas concentrações de 10^{-2} μM e 10^{-1} μM durante 24 horas em placas do tipo Lab-tek. Após tratamento as células foram submetidas a coloração direta do citoesqueleto de F-actina por faloidina-FITC. Para isso, as células foram fixadas e permeabilizadas com a solução PHEM (tampão de Pipes, HEPES, EGTA e MgCl_2) a 5% de sacarose, 4% de paraformaldeído e 0,5% de triton X-100 por 5 minutos. Em seguida, as células foram novamente fixadas em solução PHEM a 4% formaldeído por 20 minutos. Após fixação as culturas foram lavadas com a solução de PHEM + glicina (três banhos de 10 minutos). Subsequentemente as células foram marcadas com o anticorpo

faloidina-FITC (1:150) por 30 minutos em câmara escura. As laminas histológicas foram montadas e feita à análise em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i.

4.9 Ensaio de adesão celular

O ensaio de adesão celular foi realizado seguindo o protocolo de Tsukuba e colaboradores (2009). Macrófagos peritoneais foram tratados com uvaol por 24 horas nas concentrações de 10^{-2} μ M e 10^{-1} μ M. Em seguida, 5×10^4 células foram adicionadas em placas de 96 poços previamente encubada com a solução de bloqueio PBS/BSA 1% durante 45 minutos em estufa de CO₂. Após a retirada desta solução e a adição das células a placa foi novamente acondicionada em estufa de CO₂ durante 30 minutos para adesão celular. Transcorrido este período, os poços das placas foram lavados 2 vezes com meio RPMI, as células aderentes foram fixadas com PBS a 4% de formaldeído por 10 minutos e depois coradas com cristal violeta em 2% de metanol O corante foi retirado e a placa foi imersa num recipiente contendo água destilada para a retirada do excesso do corante e posta para secar em temperatura ambiente. Após secagem completa dos poços da placa, o corante foi solubilizado com água destilada a 1% de SDS por 30 minutos. Por espectrofotômetro foi feita a leitura da absorbância em 540 nm.

4.10 Ensaio de migração celular

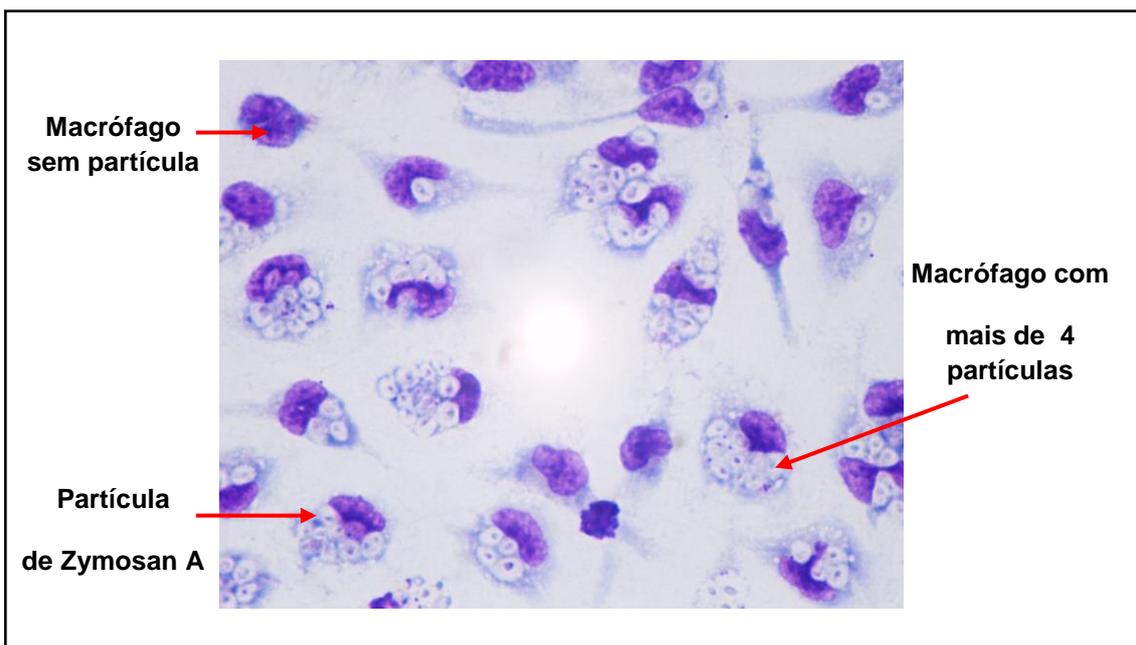
Este ensaio foi realizado seguindo o protocolo experimental utilizado por Furundzija e colaboradores (2010) com algumas modificações. A migração dos macrófagos peritoneais foi avaliada utilizando o sistema de *transwell*, que consiste de insertos com membranas de policarbonato com 10 mm de diâmetro e poros de 8,0 μ m (Corning Costar, Cambridge, USA). Primeiramente, os macrófagos peritoneais foram plaqueados em frascos de culturas médios mantidos a 37° C em estufa de CO₂ por uma hora para adesão. Durante este período foi realizado o bloqueio da membrana do inserto, com PBS/BSA a 1%, durante 45 minutos, para tornar a membrana mais homogênea. Transcorrido o tempo, macrófagos peritoneais foram removidos dos frascos de cultura utilizando PBS gelado ou com o auxílio de *cell scraper*, centrifugados, ressuspensos em meio RPMI 10% e contados em câmara de Neubauer. Um volume de 2×10^5 células foi ressuspensado em 200 μ L

meio RPMI a 0,5% BSA contendo uvaol nas concentrações de 10^{-2} μM e 10^{-1} μM e inseridos na parte superior do inserto. A mesma quantidade de células sem tratamento foi utilizada como controle. Na parte inferior foi adicionado 500 μL de RPMI BSA 0,5%. Foi permitida então a migração das células em estufa de CO_2 a 37°C por 6 horas. Em seguida, com o auxílio de uma pinça a face superior da membrana foi raspada para a retirada das células não migrantes. As células então foram fixadas em metanol puro durante 10 minutos, coradas com Giemsa (1:3) e lavadas em água destilada. As membranas de policarbonato foram removidas do inserto e montadas lâminas histológicas. As células foram analisadas em microscopia óptica invertida (Nikon Eclipse TS 100) e realizada a contagem das células migrantes em 10 campos aleatoriamente.

4.11 Ensaio de fagocitose

Este ensaio foi desenvolvido segundo protocolos utilizados por Bos e de Souza (2000) e por Batista Junior e colaboradores (2006). Macrófagos peritoneais foram cultivados em placas de 24 poços contendo lamínulas histológicas de vidro. Um volume de 5×10^5 células por poço foram tratadas com uvaol 10^{-2} μM e 10^{-1} μM por 24 horas. Após tratamento, os poços contendo as células foram lavados com PBS e a cada poço foi adicionado, 50 $\mu\text{g/ml}$ da partícula do zimosan A (*Sacharimycetes cerevisae*) por 2 horas, incluindo o controle, e mantidas em condições de umidade e temperatura em estufa de CO_2 . Após esse período, as células foram lavadas com PBS a temperatura ambiente, fixadas com metanol puro por 10 minutos e coradas com Giemsa (1:10) por 8 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas dos poços, montadas em lâminas histológicas e realizada a contagem de 100 células por grupo utilizando microscópio óptico Nikon Eclipse 50i em objetiva de 100x com óleo de imersão. A atividade fagocítica foi avaliada pelo índice de fagocitose (IF) e capacidade fagocítica (CF) utilizando a seguinte fórmula: $\text{IF}=\frac{\text{A}}{\text{B}}$, onde o A=percentagem de macrófagos que fagocitaram o zimosan e B=número de zimosan fagocitado por macrófagos; $\text{CF}=\frac{\text{A}}{\text{B}} \times 100$ média percentual de macrófagos que engolfaram no mínimo 4 partículas de zimosan (Figura 6).

Figura 6 - Macrófagos peritoneais residentes estimulados por zimosan A



Fonte: Imagem cedida por Maria Danielma dos Santos Reis.
Fotomicrografia representativa de macrófagos peritoneais em cultura após estimulação da fagocitose.

4.12 Análise estatística

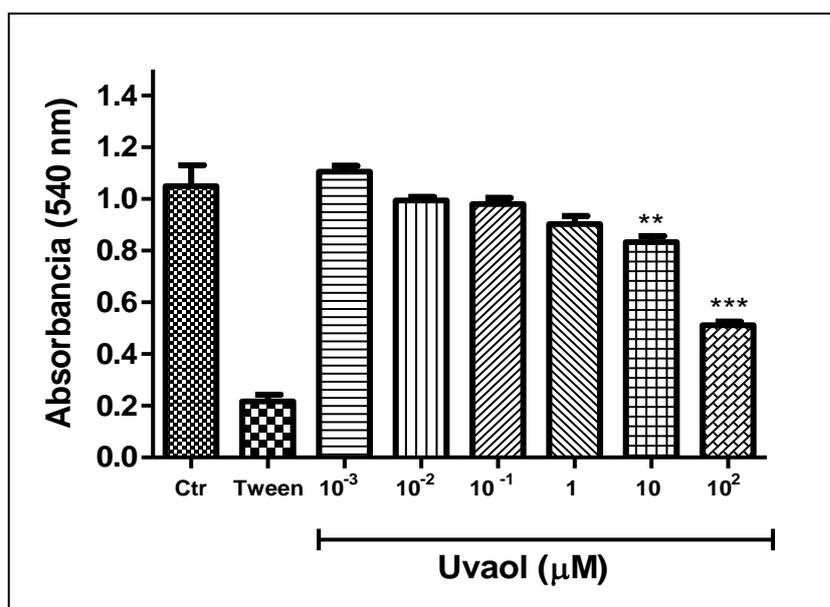
Os dados obtidos foram analisados utilizando *One-Way ANOVA* seguido do teste de Tukey. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), com um nível de significância selecionado para $p < 0.05$. Para as análises e confecção dos gráficos foi utilizado o programa de computador *GraphPad Prism* versão 5.00 (GraphPad Prism Software, Inc.).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do uvaol sobre a viabilidade de macrófagos

A viabilidade dos macrófagos peritoneais na presença de diferentes concentrações (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 10 ou 10^2 μM) do uvaol, após 24 horas de tratamento foi avaliada pelo ensaio de viabilidade celular por MTT. Como demonstrado na figura 7, os resultados indicam que os macrófagos peritoneais após tratamento com uvaol nas concentrações de 10^{-3} μM , 10^{-2} μM , 10^{-1} μM , 1 μM , por 24 horas, permaneceram viáveis quando comparados ao controle. Entretanto, as concentrações de 10 μM e 10^2 μM apresentaram-se tóxicas para as células, em que foi observada uma diminuição significativa da viabilidade das células após o mesmo período de tratamento. Considerando que o uvaol nas concentrações de 10^{-2} μM e 10^{-1} μM não alterou a viabilidade das células, estas concentrações foram utilizadas nos ensaios posteriores.

Figura 7 – Efeito do uvaol na viabilidade de macrófagos peritoneais



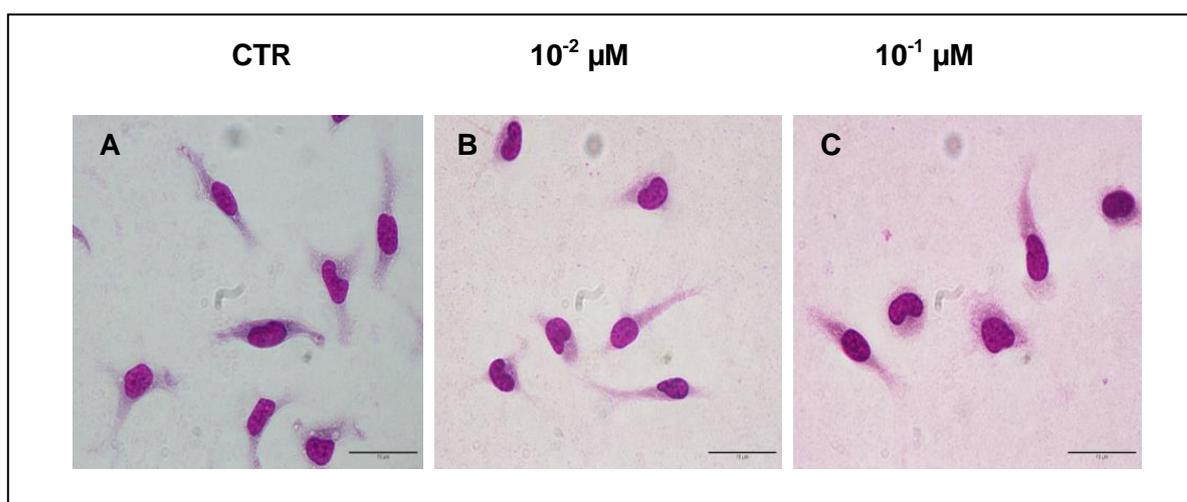
Fonte: Autor, 2013.

Os macrófagos peritoneais foram tratados com uvaol nas concentrações de 10^{-3} μM , 10^{-2} μM , 10^{-1} μM , 1 μM , 10 μM ou 10^2 μM durante 24 horas. Células sem tratamento foram utilizadas como controle. Detergente tween foi utilizado como controle de morte celular e a viabilidade foi determinada pelo ensaio de MTT. As barras representam média \pm EPM. *** $p < 0.001$ Valor estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. One-way ANOVA, seguido do teste de Tukey.

5.2 Efeito do uvaol na morfologia dos macrófagos

O ensaio de análise morfológica dos macrófagos peritoneais foi realizado após 24 horas de cultivo utilizando a coloração Giemsa. As células cultivadas sem adição de tratamento exibiram formas variadas, algumas arredondadas com citoplasma abundante contendo vacúolos, poucos prolongamentos citoplasmáticos, núcleo grande e excêntrico em forma de rim, e outras fusiformes ou estreladas com prolongamentos citoplasmáticos evidentes e núcleo central em forma de rim ou acompanhando a forma da célula. Os macrófagos tratados com uvaol nas concentrações de 10^{-2} μM e 10^{-1} μM não apresentaram alterações significativas em sua morfologia, demonstrando características semelhantes as que foram observadas nas células do grupo controle (Figura 8).

Figura 8 - Análise morfológica de macrófagos peritoneais



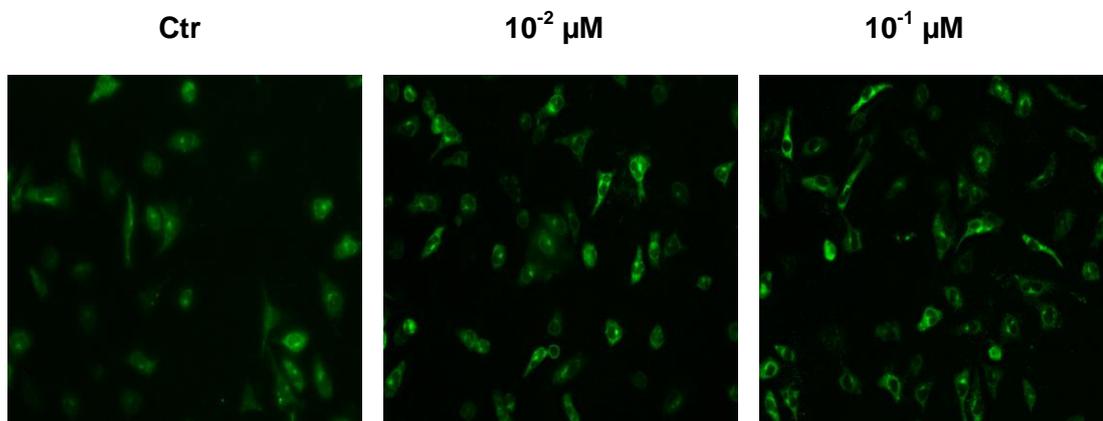
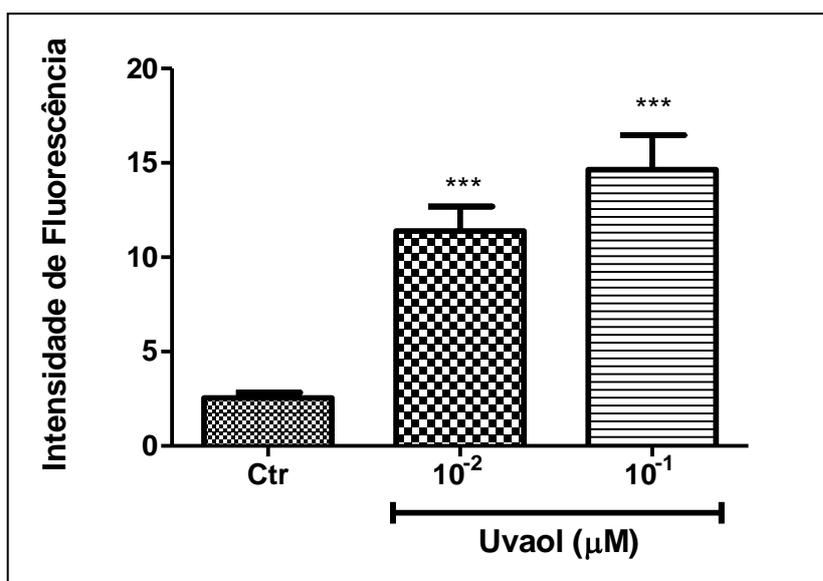
Fonte: Autor, 2013.

Fotomicrografias de macrófagos peritoneais tratados com uvaol na concentração de 10^{-2} e 10^{-1} μM por 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Coloração pelo Giemsa. Aumento de 400x.

5.3 Efeito do uvaol na produção de moléculas da MEC por macrófagos

Com o objetivo de avaliar a produção de glicoprotéínas da MEC, fibronectina e laminina, em macrófagos peritoneais após o tratamento com uvaol, foi realizado o ensaio de imunofluorescência indireta. No que se refere a fibronectina, quando as células foram tratadas com uvaol nas concentrações de 10^{-2} μM e 10^{-1} μM , por 24 horas, foi possível observar pela análise qualitativa um aumento da produção desta glicoproteína pelos macrófagos quando comparada ao grupo controle (Figura 9 A). A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou que os tratamentos estimularam de forma significativa a produção de fibronectina quando comparado ao grupo controle (Figura 9 B).

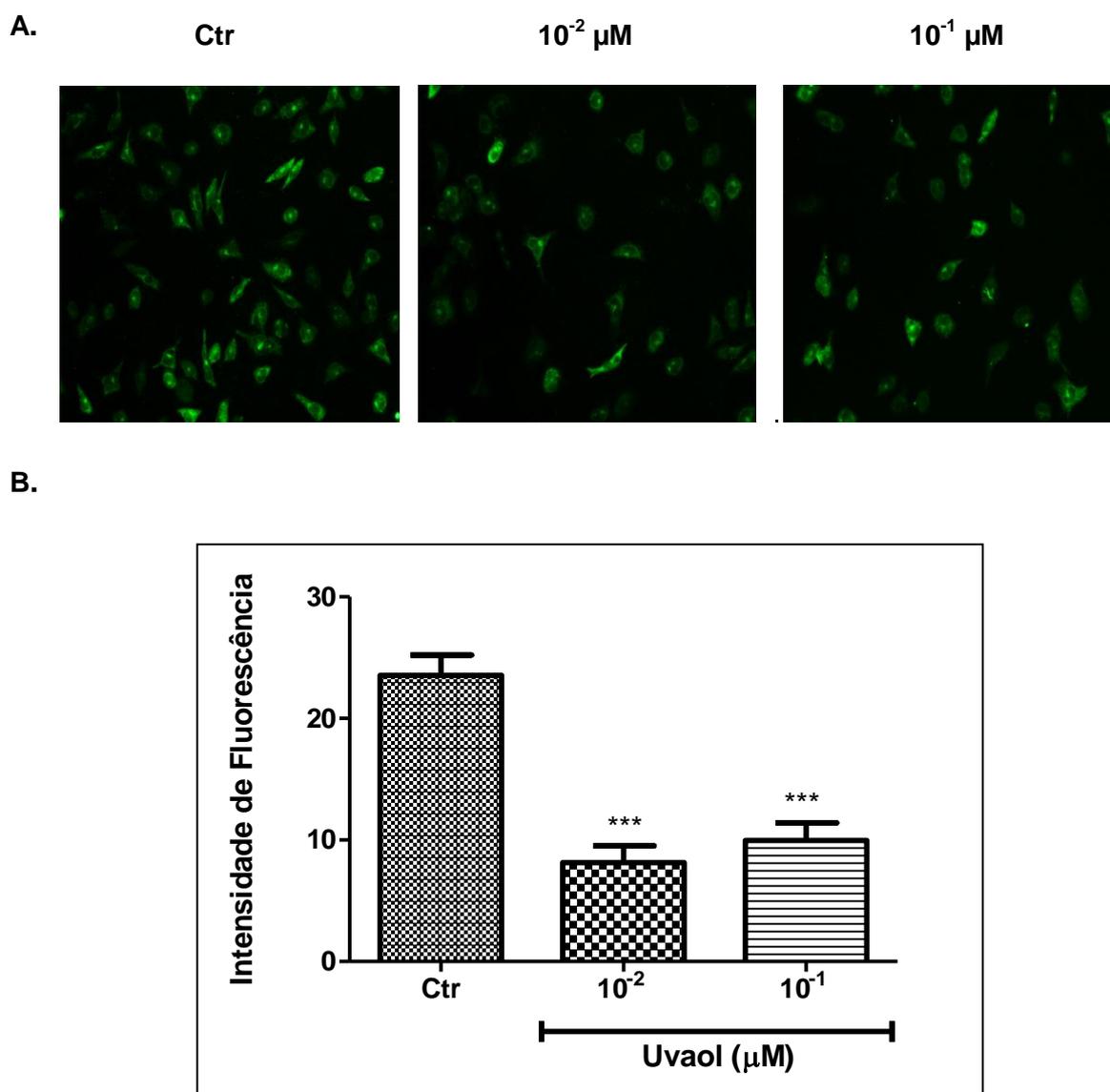
Em relação a laminina, conforme demonstrado na figura 10, foi observado pela análise qualitativa uma diminuição da produção desta glicoproteína pelos macrófagos peritoneais quando tratados com uvaol nas concentrações de 10^{-2} μM e 10^{-1} μM , por um período de 24 horas e comparado aos macrófagos do grupo controle (Figura 10 A). A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou que os tratamentos inibem de forma significativa a produção de laminina quando comparado ao grupo controle (Figura 10 B).

Figura 9 – Produção da glicoproteína fibronectina por macrófagos peritoneais**A.****B.**

Fonte: Autor, 2013.

Os macrófagos peritoneais foram tratados com uvaol nas concentrações de $10^{-2} \mu\text{M}$ ou $10^{-1} \mu\text{M}$ durante 24 horas foram analisados por microscopia de fluorescência. **(A)** Fotomicrografias mostram a produção de fibronectina. **(B)** Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência. As barras representam média \pm EPM da intensidade de fluorescência. (***) $p < 0.001$ estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. Análise feita através do software Image J. A análise estatística foi feita com do teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey.

Figura 10 – Produção da glicoproteína laminina por macrófagos peritoneais



Fonte: Autor, 2013.

Os macrófagos peritoneais foram tratados com uvaol nas concentrações de 10^{-2} μ M ou 10^{-1} μ M durante 24 horas foram analisados por microscopia de fluorescência. **(A)** Fotomicrografias mostram a produção de laminina. **(B)** Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência. As barras representam média \pm EPM da intensidade de fluorescência. (***) $p < 0.001$ estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey.

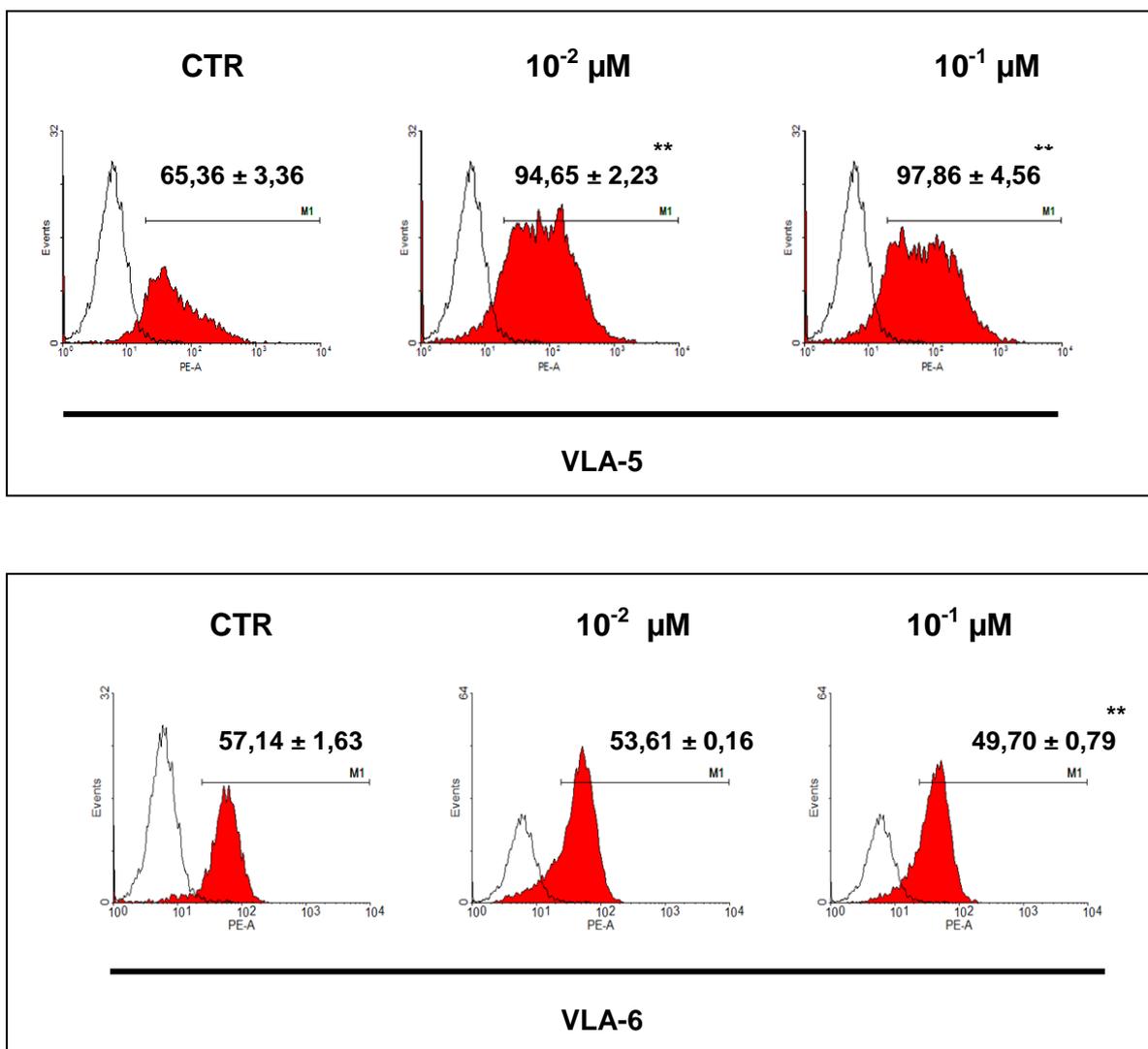
5.4 Efeito do uvaol na expressão de integrinas por macrófagos

Ao observar que o tratamento com uvaol foi capaz de influir na produção das glicoproteínas da MEC pelos macrófagos peritoneais, despertou-se o interesse de avaliar a expressão dos receptores para tais moléculas na superfície das células. Para isso, foi realizada a análise por citometria de fluxo da expressão das integrinas VLA-5 ($\alpha 5\beta 1$), receptor para fibronectina e VLA-6 ($\alpha 6\beta 1$), receptor para laminina na superfície dos macrófagos peritoneais.

Com relação a integrina VLA-5 na superfície dos macrófagos, foi observado um aumento na média de intensidade de fluorescência emitida pelas células quando foram tratadas com uvaol nas concentrações de 10^{-2} μM , 10^{-1} μM , por 24 horas e comparado ao grupo controle (Figura 11).

Ao analisar a integrina VLA-6 na superfície dos macrófagos foi constatada uma diminuição na média de intensidade de fluorescência emitida pelas células que expressam este receptor no grupo tratado com uvaol na concentração de 10^{-1} μM quando comparados ao respectivo controle. Entretanto, no tratamento com uvaol na concentração de 10^{-2} μM , não foi observado alteração na média de fluorescência em macrófagos que expressam a integrina (Figura 11).

Figura 11 - Expressão de integrinas por macrófagos peritoneais



Fonte: Autor, 2013.

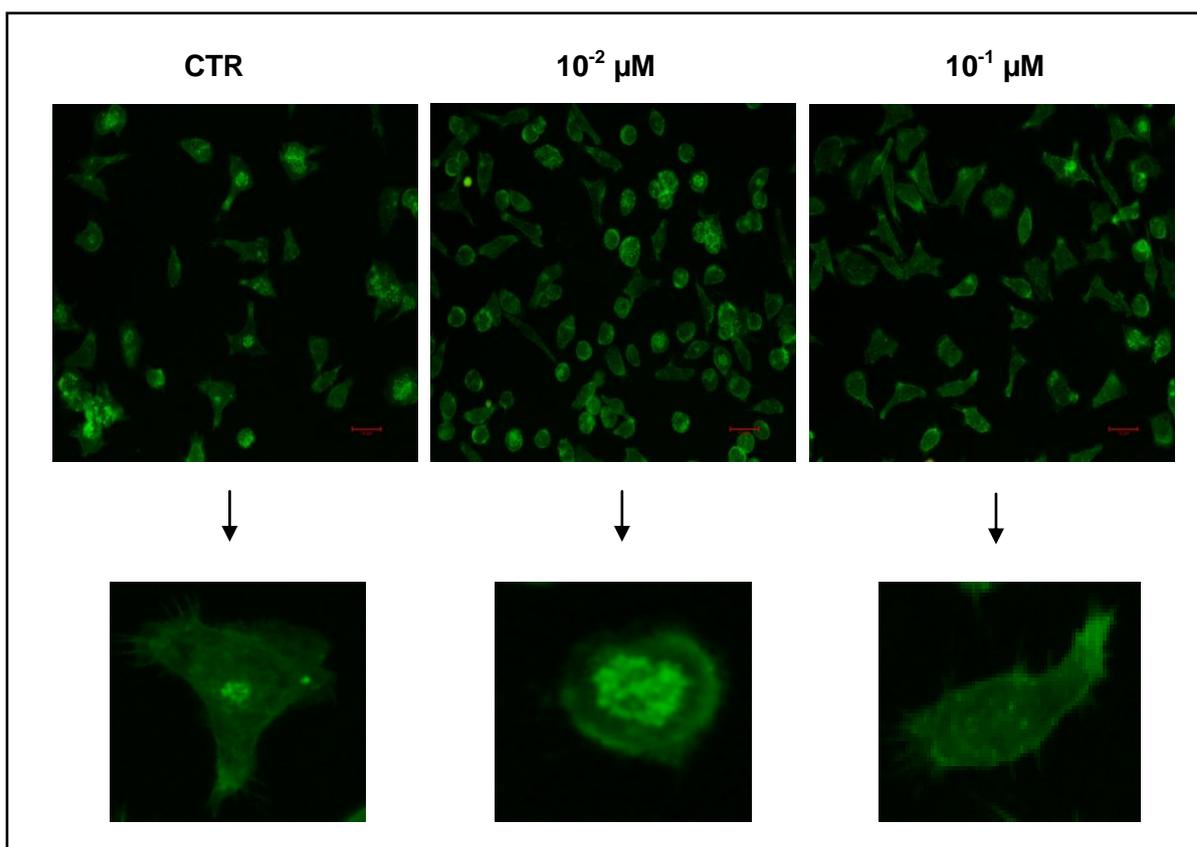
Macrófagos tratados com uvaol nas concentrações de $10^{-2} \mu\text{M}$ ou $10^{-1} \mu\text{M}$ por 24 horas, foram analisados por citometria de fluxo. Os resultados foram representados por histograma com a média de intensidade de fluorescência emitida pelas células que expressaram a integrina VLA-5, receptor para fibronectina (vermelho cheio), e VLA-6, receptor para laminina (vermelho cheio) e do controle Ig (preto vazado) de um experimento representativo. Os valores estão expressos com a média \pm EPM. *** $p < 0.001$ quando comparado ao grupo controle. One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey.

5.5 Efeito do uvaol sobre o citoesqueleto dos macrófagos

O citoesqueleto de actina é essencial para as alterações morfológicas que envolvem membrana plasmática e que participam nos processos de adesão e migração celular. Para avaliar o efeito do uvaol sobre a organização do citoesqueleto foi realizada a marcação direta da F-actina por faloidina.

Foi observado que as células cultivadas na ausência do uvaol (grupo controle), apresentaram uma organizada rede de F-actina localizada principalmente no córtex celular, evidenciando formação de lamelipódios e filopódios, ainda foram constatados pequenos pontos de adesão focal. O tratamento com uvaol na concentração de 10^{-2} μM estimulou mudanças marcantes na reorganização do citoesqueleto dos macrófagos, os quais apresentaram filamentos de F-actina localizados principalmente na região perinuclear evidenciando pouca formação de lamelipódios e filopódios (Figura 12).

A organização do citoesqueleto de F-actina das células tratadas com uvaol na concentração de 10^{-1} μM mostrou características intermediárias entre o controle e ao tratamento com uvaol 10^{-2} μM . As células mostraram-se com citoesqueleto de F-actina localizados no córtex celular ou na região perinuclear, formação de poucos lamelipódios e filopódios ainda, foi constatada pequenos pontos de adesão focal (Figura 12).

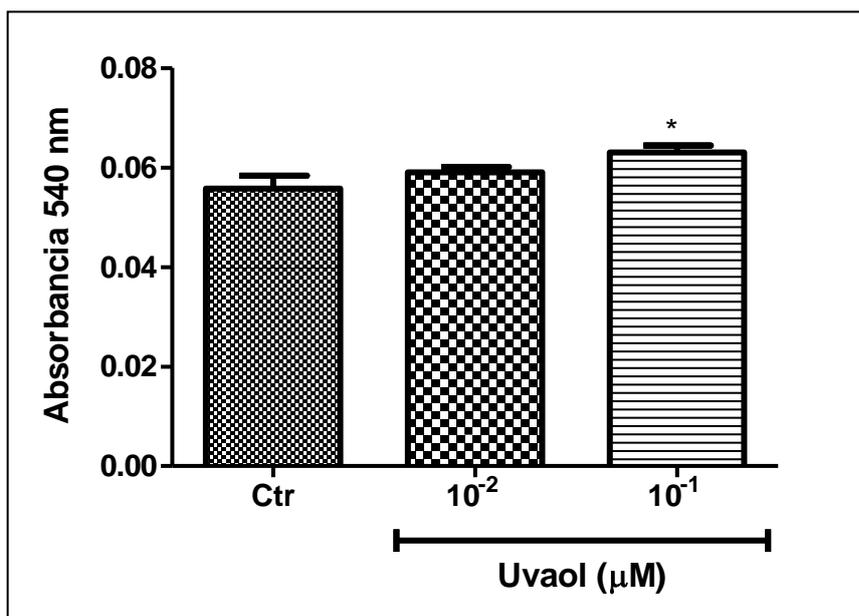
Figura 12 – Citoesqueleto de macrófagos peritoneais

Fonte: Autor, 2013.

Macrófagos peritoneais após tratamento com uvaol nas concentrações de 10^{-2} μM ou 10^{-1} μM por 24 horas foram coradas com faloidina-FITC e analisadas por imunofluorescência. Aumento de 200x (painel superior).

5.6 Efeito do uvaol na adesão celular

A capacidade adesiva dos macrófagos peritoneais foi avaliada por espectrofotometria após serem tratados *in vitro* com uvaol por um período de 24 horas. Assim, foi possível verificar que as células estimuladas com uvaol na concentração de 10^{-1} μM apresentaram um aumento significativo da adesão quando comparada ao grupo controle (sem tratamento). Entretanto, não foi observada alteração na adesão de macrófagos quando estes foram pré-tratados com uvaol na concentração de 10^{-2} μM (Figura 13).

Figura 13 - Efeito do uvaol na adesão de macrófagos peritoneais

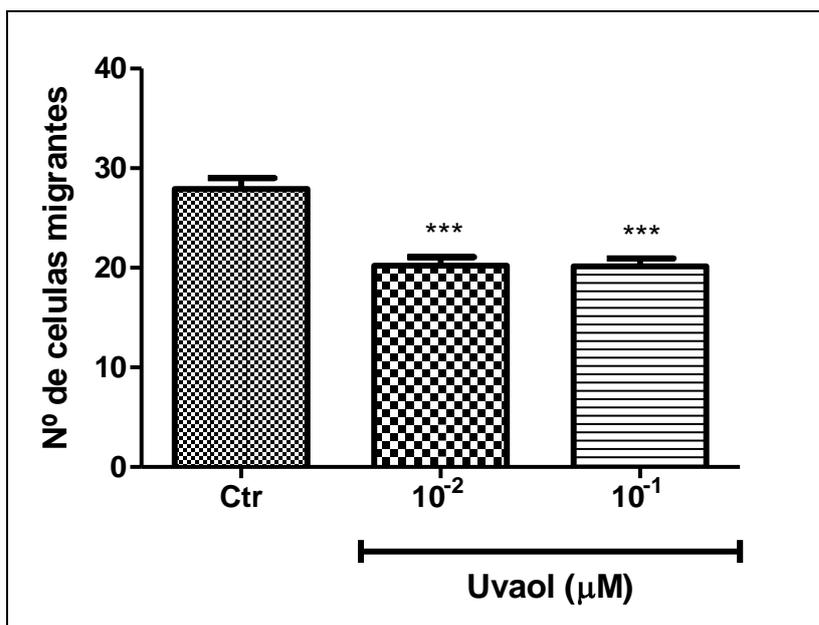
Fonte: Autor, 2013.

Macrófagos peritoneais tratados *in vitro* com uvaol nas concentrações de 10^{-2} μM ou 10^{-1} μM durante 24 horas foram submetidos ao ensaio de adesão celular. A adesão foi avaliada por espectrofotometria. Barras representam a média \pm EPM da absorbância. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle. One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

5.7 Efeito do uvaol na migração celular

Macrófagos peritoneais sob o estímulo do uvaol foram permitidos a migrar através de uma membrana de policarbonato contendo poros de 8 μm de diâmetro. A migração celular foi analisada pela contagem das células migrantes aderidas a face inferior da membrana do transwell. Nessas condições, foi verificada uma redução significativa no número de células migrantes quando os macrófagos foram tratados com uvaol, tanto na concentração de 10^{-2} μM , como também na concentração de 10^{-1} μM e comparado as células não tratadas do grupo controle (Figura 14).

Figura 14 - Efeito do uvaol na migração *in vitro* de macrófagos



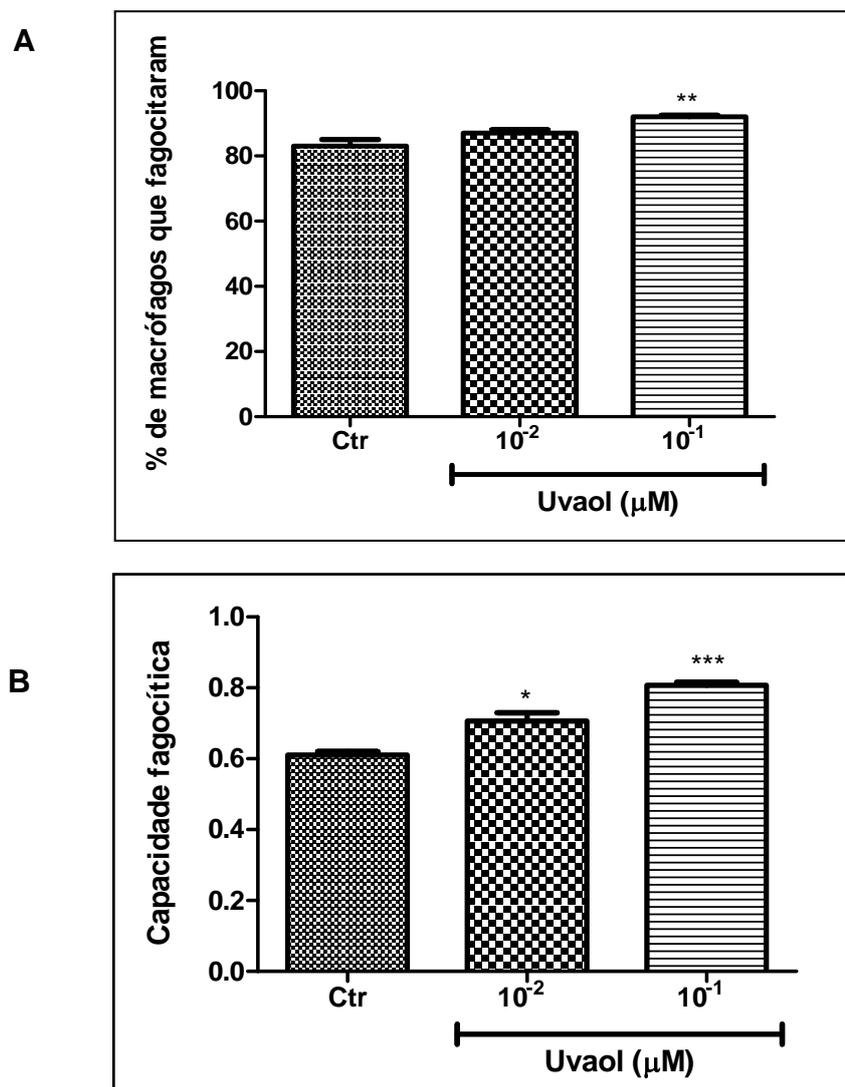
Fonte: Autor, 2013.

Macrófagos peritoneais foram submetidos ao ensaio de migração celular *in vitro* em insertos *transwell* sob o estímulo do uvaol nas concentrações de 10⁻² μM ou 10⁻¹ μM por 6 horas. Células sem tratamento foram utilizadas com controle. O gráfico representa ± EPM das células que migraram para a face inferior da membrana de *transwell*. *** p < 0.001 quando comparado ao grupo controle. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

5.8 Efeito do uvaol na atividade fagocítica de macrófagos peritoneais

A atividade fagocitária dos macrófagos está entre suas principais funções no sistema imune inato. Com o intuito de avaliar a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais frente ao tratamento com uvaol foi realizado o ensaio de fagocitose celular. Macrófagos peritoneais foram cultivados na presença de uvaol nas concentrações de 10⁻² μM ou 10⁻¹ μM por 24 horas. Após o tratamento, a fagocitose foi avaliada adicionando 50 μg/mL de zimosan A as culturas. Nessas condições, foi observado que o tratamento com uvaol na concentração de 10⁻¹ μM aumentou o percentual de células que fagocitaram partículas de zimosan bem como a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais quando comparado ao grupo controle. Entretanto, o tratamento com uvaol na concentração de 10⁻² μM aumentou somente a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais quando comparado ao grupo controle (Figura 15).

Figura 15 - Efeito do uvaol na fagocitose de macrófagos peritoneais



Fonte: Autor, 2013.

Macrófagos peritoneais foram tratados com uvaol nas concentrações de 10^{-2} μM ou 10^{-1} μM por 24 horas foram submetidos ao ensaio de fagocitose celular com zimosan A. **(A)** Número percentual médio de macrófagos que fagocitaram partículas de zimosan A. **(B)** Representa a média da capacidade fagocítica dos macrófagos após estímulo com zimosan A. Os resultados representam média \pm EPM. (*) (**) (***) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

Os macrófagos, células residentes nos diferentes tecidos do organismo, são considerados sentinelas imunológicas, onde desempenham importantes funções na restauração da homeostase tecidual. Por exemplo, a estas células é atribuída a capacidade de discriminar o próprio do não próprio, a regulação dos processos inflamatórios, bem como a reparação tecidual. Funções tão diversas desempenhadas por esta população celular despertou-se o interesse de avaliar aspectos importantes da biologia de macrófagos quando tratados *in vitro* com triterpeno pentacíclico uvaol.

A toxicidade produzida por substâncias isoladas tem sido evidenciada em diversos estudos *in vivo* e *in vitro*. Por exemplo, foi observado que camundongos tratados com o triterpeno celastrol, apresentaram sinais de toxicidade demonstrando uma postura arqueada e pele enrugada após tratamento com o terpeno por via oral (KUSY et al., 2012). Da mesma forma, fibroblastos cardíacos de ratos Wistar foram tratados por 24 horas na presença do terpeno uvaol e, apenas as doses mais altas, 25 μM e 50 μM , foram capazes de alterar a viabilidade celular, onde foi observado que após tratamento houve uma redução do número de células para os níveis inferiores aos controles (MARTÍN et al., 2012). Allouche e colaboradores (2011) demonstraram que o triterpeno uvaol diminuiu de maneira dose dependente a viabilidade de células de câncer mamário humano após 24 horas de tratamento. Estes achados demonstram que a toxicidade dos terpenos depende da célula que está sendo exposta, da origem, das concentrações que são utilizadas e do período em que ocorre o tratamento.

O presente trabalho foi realizado utilizando macrófagos residentes na cavidade peritoneal de camundongos, por serem abundantes e facilmente isolados. Primeiramente foi realizado o ensaio de viabilidade celular por MTT para determinar as concentrações do uvaol. Para isso, os macrófagos foram tratados com uvaol em concentrações que variaram de $10^2 \mu\text{M}$ a $10^{-3} \mu\text{M}$ e através deste ensaio, observou-se que apenas as altas concentrações do uvaol, $10^2 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$, foram capazes de diminuir a viabilidade dos macrófagos. Baseados neste resultado, em estudos anteriores realizados em nosso laboratório e dados da literatura que demonstram o uso de diversos terpenos na modulação celular, a concentração do uvaol estabelecida para o estudo foi de $10^{-2} \mu\text{M}$ e $10^{-1} \mu\text{M}$. Utilizando tais concentrações, foi

evidenciado que o uvaol não alterou a morfologia dos macrófagos e este resultado corrobora com o dado inicial, onde foi observado que estas concentrações não alteraram a viabilidade das células.

Em nosso estudo verificou-se que macrófagos peritoneais são hábeis em produzir moléculas da MEC, fibronectina e laminina, estando de acordo com vários dados da literatura que demonstram não somente a produção dessas moléculas, mas também de colágeno por estas células (JOHANSSON et al., 1979; ALITALO et al., 1980; WICHA; HUARD, 1983; VAAGE; LINDBLAD, 1990). A produção de componentes da matriz por células do sistema imunológico facilita a remoção de antígenos, devido a sua forte adesão a MEC, favorecendo assim a permanência das células no sítio da infecção (ADAIR-KIRK; SENIOR, 2007).

Substâncias que atuam na ativação de macrófagos durante o processo inflamatório podem atuar sobre a produção de fibronectina. O IFN- γ , a principal citocina ativadora de macrófagos, é capaz de aumentar a síntese e a secreção dessa molécula de MEC por macrófagos peritoneais (COFANO et al., 1984). Em outros estudos, foi visto que as citocinas IL-1 α , IL-6 e TNF- α são capazes de aumentar a produção de fibronectina por monócitos humanos (KITAMURA et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que a fibronectina é produzida por células imunes de perfil de resposta inflamatória Th1, destacando a importância dessa molécula em processos inflamatórios (SANDIG et al., 2009).

Neste estudo, o tratamento *in vitro* com o triterpeno pentacíclico uvaol foi capaz de aumentar a produção de fibronectina pelos macrófagos peritoneais. A fibronectina tem um papel relevante na função de macrófagos, já foi visto que esta glicoproteína é capaz de estimular a produção do fator de crescimento celular, aumenta a expressão de receptores Fc e forma uma cobertura sobre restos celulares, facilitando a fagocitose (MOSHER, 1984). Ainda, a fibronectina produzida por macrófagos alveolares, em lesões do parênquima pulmonar, facilita a migração de fibroblastos (RENNARD et al., 1981). Cory e colaboradores (2013) demonstraram que a azitromicina, um antibiótico de amplo espectro e de origem semissintética, foi capaz de aumentar a concentração de fibronectina quando macrófagos e fibroblastos foram cultivados na presença de LPS. De acordo com os dados obtidos no presente trabalho, é possível propor que o uvaol atue como um agente modulador sobre os macrófagos, induzindo a produção de fibronectina de forma semelhante às citocinas acima relatadas.

Em relação à produção de laminina, observou-se que o uvaol foi capaz de modular, de forma inibitória, a síntese desta glicoproteína. Estudos mostraram que a laminina é expressa na superfície de macrófagos peritoneais e que interfere na adesão, fagocitose, citotoxicidade e na migração de monócitos e macrófagos (SHAW; MERCURIO, 1989; PEDRAZA et al., 2000). Ainda, Mercurio e Shaw (1988) demonstraram que macrófagos aderem preferencialmente a fibronectina quando comparado a laminina e outras glicoproteínas da MEC. Apesar deste achado, macrófagos podem aderir e espriar sobre um substrato de laminina quando induzido por alguma substância estimuladora, como por exemplo, o PMA (MERCURIO; SHAW, 1988). Assim, a interação dos macrófagos com diferentes substratos, são eventos independentes e mediados por mecanismos bioquímicos distintos. Empreende-se então, que, a depender do substrato e da substância a qual está sendo exposto, macrófagos podem responder aos estímulos de forma distinta.

Estudos mostram que o aumento na produção de moléculas da matriz, bem como a diminuição, faz parte da fisiopatologia de algumas doenças (SILVA-ALMEIDA et al., 2012). Por exemplo, Ogawa e colaboradores (1986), demonstraram que a lesão hepática produziu mudanças na deposição da matriz extracelular, em que houve um aumento da produção de fibronectina, ao passo que ocorreu uma diminuição na produção de laminina, seguido de uma infiltração de neutrófilos e monócitos, e então pelo processo comum de cicatrização. O mesmo perfil de produção destas glicoproteínas foi observado após tratamento com uvaol. Desta forma, o tratamento com uvaol poderia contribuir para o processo de inflamação e cicatrização de algumas doenças.

Os macrófagos migram através dos tecidos com o auxílio das moléculas de adesão presentes em sua superfície que, por sua vez, se ligam a moléculas da matriz extracelular. Os eventos resultantes dessa interação são essenciais para a função dos macrófagos na defesa do organismo e no reparo tecidual (JULIANO; HASKILL, 1993). Dentre as moléculas de adesão que participam dessas interações estão as integrinas. Estas são receptores que atuam na adesão entre as células, na adesão das células com a matriz extracelular e na adesão entre as células e os patógenos, agindo diretamente na transmigração de leucócitos, na migração celular nos tecidos, na formação das sinapses imunológicas e na fagocitose (LUO et al., 2007). Esses receptores podem ainda transduzir sinais para dentro da célula que atuam no rearranjo do citoesqueleto, na transcrição gênica, no movimento,

proliferação e sobrevivência da célula e na ativação de funções celulares específicas (BERTON; LOWELL, 1999; SUDHAKARAN, 2007).

Considerando que o tratamento com o triterpeno uvaol foi capaz de modular a deposição de glicoproteínas da MEC pelos macrófagos, a próxima etapa do estudo foi avaliar se o triterpeno uvaol seria capaz de interferir na expressão dos receptores integrinas na superfície destas células. Através da análise por citometria de fluxo observou-se que o tratamento com uvaol foi capaz de aumentar a expressão integrina VLA-5 ($\alpha 5\beta 1$), principal receptor para a molécula fibronectina, na superfície dos macrófagos. Este resultado apresentou-se de forma a corroborar com o resultado anterior, o qual demonstrou um aumento na produção de fibronectina. A integrina VLA-5 é altamente expressa na superfície de macrófagos, e devido a sua subunidade $\beta 1$ ela possui um importante papel na quimiotaxia, o que regula a motilidade e a invasão dos macrófagos e, leva a possibilidade de diferentes morfologias associadas à motilidade destas células (ABSHIRE et al., 2011). Diante destes dados, pode-se sugerir que, o aumento da produção de fibronectina pelos macrófagos é seguido pelo aumento da expressão de seu receptor específico após exposição ao terpeno uvaol.

Outra integrina que teve sua expressão avaliada foi a VLA-6 ($\alpha 6\beta 1$), a qual possui a laminina como um dos seus ligantes. Estudos mostraram que essa integrina está envolvida na adesão e na migração de macrófagos frente à laminina (SHAW et al., 1990; SHAW; MERCURIO, 1994). O presente estudo demonstrou uma redução na produção da laminina pelos macrófagos após tratamento com uvaol, e de forma interessante, esta redução também foi evidenciada na expressão de um dos seus receptores, o VLA-6, após o mesmo tratamento. Diante destes resultados, infere-se que a exposição de macrófagos peritoneais ao tratamento com o terpeno uvaol é capaz de articular uma mudança na capacidade da célula sintetizar glicoproteínas da MEC, e de forma semelhante à expressão de seus receptores.

A interação ligante-integrina na superfície celular desencadeia a organização do citoesqueleto de actina em locais específicos para facilitar o desenvolvimento das células ou manter a estabilidade tecidual (CINES et al., 1998). Assim, realizou-se em seguida a análise do citoesqueleto de F-actina ee macrófagos peritoneais após o tratamento com uvaol e observou-se alterações na reorganização do citoesqueleto de actina, demonstrada pela formação de alguns pontos de adesão focal, lamelipodias e filopodias. Embora sendo muito importante que o citoesqueleto de F-

actina esteja intacto para a regulação de mudança na forma da célula e na geração de forças mecânicas, o comportamento mecânico da F-actina dentro da célula ainda não é totalmente conhecido (STRICKER et al., 2010).

A sinalização da fibronectina ao citoesqueleto de F-actina, por exemplo, ocorre através da ligação com integrina VLA-5 presente na superfície das células (HUVENEERS et al., 2008). A alta expressão desta integrina após o tratamento com uvaol pode ter causado o rearranjo do citoesqueleto de F-actina. Assim, sendo o uvaol uma substância capaz de alterar a organização dos filamentos de F-actina dentro do citoplasma de macrófagos, poderá contribuir para a funcionalidade das células, já que motilidade, migração e adesão são funções que estão diretamente ligadas à organização do citoesqueleto (VEREYKEN et al., 2011).

Desta maneira, instigados pela possibilidade do uvaol modular a motilidade do macrófago peritoneal, realizou-se os ensaios funcionais de adesão e migração celular. Foi constatado que o tratamento com uvaol aumentou a capacidade adesiva dos macrófagos peritoneais. De forma recíproca, a adesão celular influencia na organização do citoesqueleto, bem como o citoesqueleto afeta a organização e função das moléculas adesivas, como as integrinas (SCHOENWAEELDER; BURRIEDGE, 1999). Sabe-se que as adesões focais são grandes complexos de proteínas organizados na superfície basal da célula que conecta a matriz extracelular ao citoesqueleto através das integrinas, e estudos avaliam a função dessas estruturas nos processos de adesão e migração (KIM; WIRTZ, 2012). Assim, os complexos de adesões focais, formados após o tratamento com uvaol podem influenciar as funções dos macrófagos. Mediante os resultados supracitados, é possível sugerir que a modulação da expressão das integrinas, o rearranjo do citoesqueleto celular com a formação de complexos de adesão focal, lamelopodias e filopodias tenham estimulado a atividade adesiva dos macrófagos peritoneais.

O movimento celular é um processo complexo que envolve a extensão frontal da membrana plasmática e posteriormente a estabilização da adesão celular *versus* matriz extracelular (QIN; ZHANG, 2010). Além disso, os complexos de adesão focal tem a capacidade de conectar fisicamente a matriz extracelular e o citoesqueleto, devido a esta interação, alguns estudos especulam a atuação dos complexos de adesão focal em outro processo funcional da célula, a migração celular (KIM; WIRTZ, 2012; RIDLEY et al., 2003). A capacidade da célula em alcançar locais infeccionados e tecidos lesados é essencial para sua função e vigilância

imunológica. Esta motilidade da célula depende de diversos fatores, incluindo as características físicas e bioquímicas da matriz extracelular. Assim, o entendimento dos diferentes modos de migração celular é vital para compreender uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos (EVEN-RAM; YAMADA, 2005; RIDLEY et al., 2003).

Neste contexto, avaliou-se a capacidade migratória dos macrófagos frente ao tratamento com uvaol, e foi observada uma diminuição no número de células migrantes. O repertório de expressão tecidual das moléculas da matriz extracelular bem como das integrinas, está diretamente relacionado com fenótipos celulares. Ou seja, o perfil tecidual da expressão das integrinas e moléculas da matriz influenciam diretamente nos processos de adesão e migração celular (HUTTENLOCHER; HORWITZ, 2011), e as integrinas podem participar do processo migratório de macrófagos (YAKUBENKO et al., 2008). Danen e colaboradores (2002) demonstraram que a superexpressão da integrina $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) em células deficientes promove uma maior adesão célula *versus* matriz extracelular, afetando fortemente a migração celular (TRUONG; DANEN, 2009).

Além da ação da integrina VLA-5, estudos demonstram que a expressão da integrina VLA-6 também está associada com o processo de migração celular. Macrófagos que foram transfectados com a subunidade α da integrina VLA-6 migraram de forma eficaz. Após a deleção deste mesmo domínio houve uma diminuição significativa da capacidade migratória dessas células, demonstrando que a baixa expressão de VLA-6 é capaz de afetar a migração celular (SHAW; MERCURIO, 1994; SHAW; MERCURIO, 1995).

Mediante a sequência dos resultados obtidos, é possível propor que este seria um resultado esperado. Pois, macrófagos tratados com o uvaol demonstraram uma maior produção de fibronectina, bem como uma maior expressão da integrina $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) e modulou a formação de complexos de adesões focais, desta maneira possibilitou que as células aumentassem a sua capacidade adesiva e conseqüentemente diminuíssem a sua motilidade.

A função principal dos macrófagos é a fagocitose, é através deste processo que estas células destroem micro-organismos e eliminam restos celulares dos tecidos. Nos ensaios de fagocitose em que os macrófagos peritoneais foram tratados com uvaol foi possível observar um aumento na atividade fagocitária destas células, havendo um aumento de maneira dose dependente tanto na capacidade

fagocítica quanto na porcentagem de macrófagos que fagocitaram. A resposta fagocítica das células da imunidade inata, como os macrófagos, é definida pela ativação de uma rede complexa de sinalização estimulada através do contato microbiano. Muitas proteínas têm sido demonstradas por ter participação no processo de fagocitose, como as lectinas, proteínas do sistema complemento e também as integrinas (UNDERHILL; OZINSKY, 2002).

A cadeia $\beta 1$ da integrina tem demonstrado importante papel na atividade fagocitária dos macrófagos (BHALLA et al., 2009). Wang e colaboradores (2008) demonstraram que macrófagos nocautes para a subunidade $\beta 1$ exibiram uma fagocitose deficiente para o estreptococos e também para o *Staphylococcus aureus*, além de uma maturação deficiente do fagossomo após a internalização de *Escherichia coli*, prejudicando assim a atividade bactericida da célula. Ainda, estudos demonstram que componentes da MEC funcionam como um ligante para os patógenos no hospedeiro. Os micro-organismos se ligam a componentes adesivos da MEC como fibronectina, colágeno e laminina, e estes servem como pontos de ancoragem (HE et al., 2003; JIA et al., 2005). Além disso, o citoesqueleto de actina também está envolvido neste processo. Visto que, a fagocitose é iniciada quando uma partícula se liga a um receptor de superfície celular, levando a reorganização do citoesqueleto de F-actina, proporcionando assim a força necessária para a formação dos fagossomos. Portanto a regulação da dinâmica do citoesqueleto de F-actina é essencial para o controle da fagocitose (ASLAM et al., 2012).

Assim, a alta expressão da integrina VLA-5 após tratamento com uvaol, a reorganização do citoesqueleto e a alta expressão de moléculas adesivas da MEC, como a fibronectina, podem favorecer o aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais submetidos ao tratamento com o uvaol. Contudo, estudos incluindo análises da subunidade $\beta 1$ das integrinas devem ser realizados para confirmar a hipótese sugerida.

6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste estudo demonstram que o triterpeno uvaol exerce efeitos importantes na fisiologia de macrófagos. O tratamento *in vitro* estimulou a produção de fibronectina bem como a expressão do seu receptor, a integrina VLA-5; inibiu a produção de laminina bem como a expressão do seu receptor, a integrina VLA-6; promoveu a reorganização do citoesqueleto de F-actina; e não interferiu na viabilidade celular. Além disso, nos ensaios funcionais foi visto que o uvaol induziu a adesão; diminuiu a capacidade migratória; e aumentou a capacidade fagocítica dos macrófagos.

Em conjunto, os resultados sugerem que o triterpeno uvaol tem um potencial efeito modulador em macrófagos peritoneais de camundongos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. Edição 5. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABSHIRE, M.Y. et al. Macrophage motility requires distinct $\alpha 5 \beta 1$ /FAK and $\alpha 4 \beta 1$ /paxillin signaling events. **J Leukoc Biol**, v. 89, p. 251-257, 2011.

ADAIR-KIRK, T.L.; SENIOR, R.M. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, p. 1101-1110, 2008.

ADEREM, A. Phagocytosis and the Inflammatory Response. **J Infect Dis**, v. 187, p. S340-345, 2003.

ALITALO, K.; HOVI, T.; VAHERI, A. Fibronectin is produced by human macrophages. **J Exp Med**, v. 151, p. 602-613, 1980.

ALLOUCHE, Y. et al. Fruit Quality and Olive Leaf and Stone Addition Affect Picual Virgin Olive Oil Triterpenic Content. **J Agric. Food Chem**, v. 57, p. 8998-9001, 2009.

ALLOUCHE, Y. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. **Food Chem Toxicol**, v. 48, p. 2885-2890, 2010.

ALLOUCHE, Y. et al. Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-apoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Their Effects on DNA Damage. **Agric Food Chem**, v. 59, p. 121-130, 2011

ANCUTA, P. et al. Fractaline preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. **J Exp Med**, v. 197, p. 1701-1707, 2003.

ANITSCHKOW, N. On the morphodynamics of coronary sclerosis of the heart. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 49, p. 426-432, 1960.

ASLAM, S.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, A. The Calmodulin-like calcium binding protein EhCaBP3 of *Entamoeba histolytica* regulates phagocytosis and is involved in actin dynamics. **PLoS Pathog**, v. 8, p. 1-14, 2012.

AUMAILLEY, M.; SMYTH, N. The role of laminins in basement membrane function. **J Anat**, v. 193, p. 1-21, 1998.

AUYEUNG, K.K.; KO, J.K. Novel herbal flavonoids promote apoptosis but differentially induce cell cycle arrest in human colon cancer cell. **Invest New Drugs**, v. 28, p. 1-13, 2010.

AZIZ-SEIBLE, R.S.; CASEY, C.A. Fibronectin: Functional character and role in alcoholic liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 17, p. 2482-2499, 2011.

BERTON, G.; LOWELL, C.A. Integrin Signalling in Neutrophils and Macrophages. **Cell Signal**, v. 11, p. 621-635, 1999.

BATISTA, M.L. Jr. et al. Changes in the pro-inflammatory cytokine production and peritoneal macrophage function in rats with chronic heart failure. **Cytokine**, v. 34, p. 284-290, 2006.

BHALLA, S. et al. beta(1)-integrin mediates pressure-stimulated phagocytosis. **Am J Surg**, v. 198, p. 611-616, 2009.

BHARGAVA, P.; LEE, C.H. Role and function of macrophages in the metabolic syndrome. **Biochem J**, v. 444, p. 253-262, 2012.

BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 1-9, 2012.

BOS, H.; DE SOUZA, W. Phagocytosis of yeast: a method for concurrent quantification of binding and internalization using differential interference contrast microscopy. **J Immunol Methods**, v. 238, p. 29-43, 2000.

BOSMAN, F.T.; STAMENKOVIC, I., Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J Pathol**, v. 4, p. 423-428, 2003.

BOTTAZZI, B. et al. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. **Annu Ver Immunol**, v. 28, p. 157-183, 2010.

BOURSUK, O.S. et al. Effects of drugs of plant origin on the development of the immune response. **Bull Exp Biol Med**, v. 151, p. 194-196, 2011.

CAPUTO, R. et al. Triterpenes in husks of *Olea europaea*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1551-1552, 1974.

CAVAILLON, J.M. Cytokines and macrophages. **Biomed Pharmacother**, v. 48, p. 445-453, 1994.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CESARO, F. **Avaliação das atividades linfoproliferativa e citotóxica dos extratos metanólicos e frações de *Ipomea pés-caprae* e *Vernonia scorpioides***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2009, p. 94. Disponível em:
< http://www6.univali.br/tede/tede_busca/arquivo.php?codArquivo=661 > Acesso em: 05 Mar. 2013.

CHAGNOT, C. et al. Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. **Cell Microbiol**, v. 4, p. 1687-1696, 2012.

CINES, D.B. et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**, v. 91, p. 3527-3561, 1998.

COFANO, F. et al. Mouse immune interferon enhances fibronectin production of elicited macrophages. **J Immunol**, v. 6, p. 3102-3106, 1984.

CORRÊA, V.S.C. et al. Atividade funcional de fagócitos na presença do fitoterápico "Mais Vida". **Rev Bras PI Med**, v. 8, p. 26-32, 2006.

CORY, T.J. et al. Azithromycin increases in vitro fibronectin production through interactions between macrophages and fibroblasts stimulated with *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, p. 840-851, 2013.

DALON, I.; BROWN, N.H. Integrins and the actin cytoskeleton. **Curr Opin Cell Biol**, v.19, p. 43-50, 2007.

DANEN, E.H. et al. The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. **J Cell Biol**, v. 159, p. 1071-1086, 2002.

DANIELA, L. et al. Anti-inflammatory effects of concentrated ethanol extracts of Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) callus cultures towards human keratinocytes and endothelial cells. **Mediators Inflamm**, p. 1-12, 2012.

DA SILVA FILHO, A.A. et al. In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, p. 478-482, 2009.

DINCHEV, D. et al. Distribution of steroidal saponins in *tribulus terrestris* from different geographical regions. **Phytochemistry**, v. 69, p. 176-186, 2008.

DIXON, R.A.; STEELE, C.L. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic. **Trends Plant Sci**, v. 4, p. 394-400, 1999.

DOS SANTOS OLIVEIRA, M.B. et al. *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber ethanolic extract: antioxidant capacity and electrochemical investigation. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 16, p. 121-129, 2013.

DUNKELBERGER, J.R.; SONG, W.C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Res**, v. 20, p. 34-50, 2010.

DUQUESNOY, E.; CASTOLA, V.; CASANOVA, J. Triterpenes in the hexane extract of leaves of *Olea europea* L.: analysis using ¹³C-NMR spectroscopy. **Phytochem Anal**, v. 18, p. 347-353, 2007.

EVEN-RAM, S.; YAMADA, K.M. Cell migration in 3D matrix. **Curr Opin Cell Biol**, v. 17, p. 524-532, 2005.

FEGHALI, K.; GRENIER, D. Priming Effect of Fibronectin Fragments on the Macrophage Inflammatory Response: Potential Contribution to Periodontitis. **Inflammation**, v. 35, p. 1696-1705, 2012.

FISCHER, G. et al. Imunomodulação pela própolis. **Arq Inst Biol**, v. 75, p. 247-253, 2008.

FRAILE, L. et al. Immunomodulatory properties of beta-sitosterol in pig immune responses. **Int Immunopharmacol**, v. 13, p. 316-321, 2012.

FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **Br J Nutr**, v. 88, p. 587-605, 2002.

FURUNDZILA, V. et al. IGF-1 increases macrophage motility via PKC/p38-dependent alphabeta3-integrin inside-out signaling. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 3, p. 786-791, 2010.

GEIGER, B.; SPATZ, J.P.; BERSHADSKY, A.D. Environmental sensing through focal adhesions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, V. 10, P. 21-33, 2009.

GORDON, S. The macrophage: Past, present and future. **Eur J Immunol**, v. 37. p. s9-s17, 2007.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, v. 5, p. 953-964, 2005.

GUINDA, A. et al. Pentacyclic Triterpenoids from Olive Fruit and Leaf. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 9685-9691, 2010.

HAMMAN, J.H. Composition and applications of Aloe vera leaf gel. **Molecules**, v. 13, p. 1599-1616, 2008.

HE, Y.W. et al. The extracellular matrix protein mindin is a pattern-recognition molecule for microbial pathogens. **Nat Immunol**, v. 5, p. 88-97, 2004.

HILL, R.A.; CANNOLY, J.D. Triterpenoids. **Nat Prod Rep**, v. 29, p. 780-818, 2012.

HONG, X.X. et al. New steroidal saponins from the bulbs of *Lilium brownii* var. *viridulum*. **Carbohydr Res**, v. 361, p. 19-26, 2012.

HORIUCHI, K. et al. Antimicrobial activity of Oleanolic Acid from *Salvia officinalis* and related compounds on Vancomycin – Resistant enterococci (VRE). **Bio Pharm Bull**, v. 30, p. 1147-1149, 2007.

HUANG, D.H. et al. Studies on the chemical constituents of *Coleus forskohlii* transplanted in Tongcheng and their antitumor activity. **Zhong Yao Cai**, v. 34, p. 375-378, 2011.

HUME, D.A. The mononuclear phagocyte system. **Curr Opin Immunol**, v. 18, p. 49-53, 2006.

HUSKENS, D.; SCHOLS, D. Algal Lectins as Potential HIV Microbicide Candidates. **Mar Drugs**, v. 10, p. 1476-1497, 2012.

HUTTENLOCHER, A.; HORWITZ, A.R. Integrins in Cell Migration. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, p. 1-9, 2011.

HUVENEERS, S. et al. Binding of soluble fibronectin to integrin $\alpha 5 \beta 1$ – link to focal adhesion redistribution and contractile shape. **J Cell Sci**, v. 121, p. 2452-2462, 2008.

HYNES, R.O.; YAMADA, K.M. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. **J Cell Biol**, v. 95, p. 369-377, 1982.

IMHOF, B.A.; AURRAND-LIONS, M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. **Nat Rev Immunol**, v. 4, p. 432-434, 2004.

IVANOV, V. et al. Plant-derived micronutrients suppress monocyte adhesion to cultured human aortic Endothelial cell layer by modulating its extracellular matrix composition. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 52, p. 55-65, 2008.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia** – O sistema imunológico na saúde e na doença. 6^a Ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

JIA, W.; LI, H.; HE, I.W. The extracellular matrix protein mindin serves as an integrin ligand and is critical for inflammatory cell recruitment. **Blood**, v. 106, p. 3854-3859, 2005.

JOHANSSON, S. et al. In vitro biosynthesis of cold insoluble globulin (fibronectin) by mouse peritoneal macrophages. **FEBS Lett**, v. 2, p. 313-316, 1979.

JULIANO, R.L.; HASKILL, S. Signal transduction from the extracellular matrix. **J Cell Biol**, v. 120, p. 577-585, 1993.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, p. 392-401, 2006.

KANJWANI, D.G. et al. Evaluation of Immunomodulatory Activity of Methanolic Extract of Piper betel. **Scand J Immunol**, v. 67, p. 589-593, 2008.

KELSALL, A. et al. Dietary lectins can stimulate pancreatic growth in the rat. **Int J Exp Pathol**, v. 83, p. 203-208, 2002.

KITAMURA, N. et al. Cultured human monocytes secrete fibronectin in response to activation by proinflammatory cytokines. **Clin Exp Immunol**, v. 120, p. 66-70, 2000.

KIM, D.H.; WIRTZ, D. Focal adhesion size uniquely predicts cell migration. **FASEB J**, 2012.

KUSY, S. et al. Development of B Cells and Erythrocytes Is Specifically Impaired by the Drug Celastrol in Mice. **Plos one**, v. 7, p. 1-5, 2012.

LABRO, M.T. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or 'immuno-fairy tales'? **Clin Microbiol Ver**, v. 13, p. 615-630, 2000.

LIU, X. et al. Steroidal saponins from Smilacina japonica. **Fitoterapia**, v. 83, p. 812-816, 2012.

LUCAS, A.D.; GREAVES, D.R. Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. **Expert Rev Mol Med**, v. 3, p. 1-18, 2001.

LUO, B.; CARMAN, C.V.; SPRINGER, T.A. Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 619-647, 2007.

MARTIN, A.M. et al. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpene from olive pomace oil in human mononuclear cells. **Cytokine**, v. 36, p. 211-217, 2006.

MARTIN, R. et al V.R. Natural triterpenic diols promote apoptosis in astrocytoma cells through ROS-Mediated mitochondrial depolarization and JNK activation. **Plos one**, v. 4, p. e5975, 2009.

MARTÍN, R. et al. DIOL Triterpenes Block Profibrotic Effects of Angiotensin II and Protect from Cardiac Hypertrophy. **Plos One**, v. 7, p. 1-9, 2012.

MARTINS, A. et al. Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 37, p. 438-444, 2011.

MESSAOUDI, I. et al. Nonhuman Primate Models of Human Immunology. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, p. 261-273, 2011.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, p. 819-826, 2007.

MERCURIO, A.M.; SHAW, L.M. Macrophage interactions with laminin: PMA selectively induces the adherence and spreading of mouse macrophages on a laminin substratum. **J Cell Biol**, v. 107, p. 1873-1880, 1988.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MOSHER, D.F. Physiology of fibronectin. **Annu Rev Med**, v. 35, p. 561-575, 1984.

MULVIHILL, E.E.; HUFF, M.W. Citrus flavonoids and the prevention of atherosclerosis. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, v. 12, p. 84-91, 2012.

NACHBAR, M.S.; OPPENHEIM, J.D. Lectins in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. **Am J Clin Nutr**, v. 33, p. 2338-2345, 1980.

OGAWA, K. et al. Sequential Changes of Extracellular Matrix and Proliferation of Ito Cells With Enhanced Expression of Desmin and Actin in Focal Hepatic Injury. **Am J Pathol**, v. 125, p. 611-619, 1986.

PATARROYO, M.; TRYGGVASON, K.; VIRTANEN, I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. **Semin Cancer Biol**, v. 12, p. 197-207, 2002.

PEAKMAN, E.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**, 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara koogan S.A. ,1999.

PEDRAZA, C. et al. Monocytic cells synthesize, adhere to, and migrate on laminin-8 (alpha 4 beta 1 gamma 1). **J Immunol**, v. 165, p. 5831-5838, 2000.

PEREIRA DA SILVA, G.; CARVALHO, F.C.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Neutrophil activation induced by plant lectins: Modulation of inflammatory processes. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 11, p. 433-441, 2012.

PILLOZZI, S.; BECCHETTI, A. Ion Channels in Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells Int**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

POLLARD, J.W. Trophic macrophages in development and disease. **Nat Rev Immunol**, v 9, p. 259-270, 2009.

POZZI, A.; ZENT, R. Integrins: Sensors of extracellular matrix and modulators of cell function. **Nephron Exp Nephrol**, v. 94, p. e77-e84, 2003.

QIN, X.J. et al. Steroidal saponin with antimicrobial activity from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Steroids**, v. 77, p. 1242-1248, 2012.

QIN, L.; ZHANG, M. Maspin Regulates Endothelial Cell Adhesion and Migration through an Integrin Signaling Pathway. **J Biol Chem**, v. 15, p. 32360-32369, 2010.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RENNARD, S.I. et al. Production of fibronectin by the human alveolar macrophage: mechanism for the recruitment of fibroblasts to sites of tissue injury in interstitial lung diseases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, p. 7147-7151, 1981.

RESCHENER, A. et al. Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. **Clin Exp Immunol**, v. 152, 219-226, 2008.

RIDLEY, A.J. et al. Cell migration: Integrating signals from front to back. **Science**, v. 302, p. 1704-1709, 2003.

ROSS, S. Atherosclerosis - an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v. 340, p. 115-126, 1999.

SAHA, P. et al. The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, p. 109-118, 2009.

SANDIG, H. et al. Fibronectin is a TH1-specific molecule in human subjects. **J Allergy Clin Immunol**, v. 3, p. 528-535, 2009.

SAWAI, S.; SAITO, K. Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. **Front Plant Sci**, v. 2, p. 1-8, 2011.

SCHMIDT, S.V.; NINO-CASTRO, A.C.; SCHULTZE, J.L. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. **Front Immunol**, v. 3, p. 1-17, 2012.

SCHOENWAELDER, S.M.; BURRIEDGE, K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. **Curr Opin Cell Biol**, v. 11, p. 274-286, 1999.

SHARMA, U.; KUMAR, N.; SINGH, B. Furostanol saponin and diphenylpentendiol from the roots of *Asparagus racemosus*. **Nat Prod Commun**, v. 7, p. 995-998, 2012.

SHAW, L.M.; MESSIER, J.M.; MERCURIO, A.M. The activation dependent adhesion of macrophages to laminin involves cytoskeletal anchoring and phosphorylation of the alpha 6 beta 1 integrin. **J Cell Biol**, v. 110, p. 2167-2174, 1990.

SHAW, L.M.; MERCURIO, A.M. Interferon gamma and lipopolysaccharide promote macrophage adherence to basement membrane glycoproteins. **J Exp Med**, v. 1, p. 303-308, 1989.

SHAW, L.M.; MERCURIO, A.M. Regulation of Cellular Interactions with Laminin by Integrin Cytoplasmic Domains: The A and B Structural Variants of the alpha6 beta1 Integrin Differentially Modulate the Adhesive Strength, Morphology, and Migration of Macrophages. **Mol Biol Cell**, v. 5, p. 679-690, 1994.

SHAW, L.M.; MERCURIO, A.M. Regulation of alpha 6 beta 1 integrin-mediated migration in macrophages. **Agents Actions Suppl**, v. 47, p. 101-106, 1995.

SHMIDT, S.; FRIEDL, P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. **Cell Tissue Res**, v. 339, p. 83-92, 2010.

SIGALOV, A.B. Evolution of immunity: no development without risk. **Immunol Res**, v. 53, p. 176-181, 2012.

SILVA-ALMEIDA, M. et al. Extracellular matrix alterations in experimental *Leishmania amazonensis* infection in susceptible and resistant mice. **Vet Res**, v. 43, p. 1-9, 2012.

SINGH, P.; CARRAHER, C.; SCHWARZBAUER, J.E. Assembly of fibronectin extracellular matrix. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 26, p. 397-419, 2010.

SINKIN, R.A. et al. Fibronectin expression in bronchopulmonary dysplasia. **Pediatr Dev Pathol**, v. 1, p. 494-502, 1998.

STITI, N.; TRIKI, S.; HARTMANN, M.A. Formation of triterpenoids throughout *Olea europaea* fruit ontogeny. **Lipids**, v. 42, p. 55-67, 2007.

STRIKER, J.; FALZONE, T.; GARDEL, M.L. Mechanics of the F-actin cytoskeleton. **J Biomech**, v. 43, p. 9-14, 2010.

SUDHAKARAN, P.R.; RADHIKA, A.; JACOB, S.S. Monocyte macrophage differentiation in vitro: Fibronectin-dependent upregulation of certain macrophage-specific activities. **Glycoconj J**, v. 24, p. 49-55, 2007.

SZAKIEL, A. et al. Comparison of the triterpenoid content of berries and leaves of lingonberry *Vaccinium vitisidaea* from Filan and Poland. **J Agric Food Chem**, v. 60, p. 4994-5002, 2012.

TARR, A.W.; URBANOWICZ, R.A.; BALL, J.K. The Role of Humoral Innate Immunity in Hepatitis C Virus Infection. **Viruses**, v. 4, p. 1-27, 2012.

TAYLOR, P.R. et al. Macrophage receptors and immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 901-944, 2005.

TISSIERES, P. et al. Innate immune deficiency of extremely premature neonates can be reversed by interferon- γ . **PLoS One**, v. 7, p. 1-11, 2012.

TRUONG, H.; DANEN, E.H. Integrin switching modulates adhesion dynamics and cell migration. **Cell Adh Migr**, v. 3, p. 179-181, 2009.

TSUKUBA, T. et al. Impaired chemotaxis and cell adhesion due to decrease in several cell-surface receptors in cathepsin E-deficient macrophages. **J biochem**, v. 5, p. 565-73.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 825-852, 2002.

VAAGE, J.; LINDBLAD, W.J. Production of collagen type I by mouse peritoneal macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 3, p. 274-280, 1990.

VAN FURTH, R. et al. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. **Bull World Health Organ**, v. 46, p. 845-852, 1972.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 27, p. 1-7, 2006.

VEREYKEN, E.J. et al. Classically and alternatively activated bone marrow derived macrophages differ in cytoskeletal functions and migration towards specific CNS cell types. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 1-16, 2011.

VOLKMAN, A.; GOWANS, J.L. The origem of macrophages from bone marrow in the rat. **Br J Exp Pathol**, v. 46, p. 62-70, 1965.

VON DER MARK, K.; VON DER MARK, H.; GOODMAN, S. Cellular responses to extracellular matrix. **Kidney Int**, v. 41, p. 632-640, 1992.

WANG, Q.Q. et al. Integrin beta 1 regulates phagosome maturation in macrophages through Rac expression. **J Immunol**, v. 180, p. 2419-2428, 2008.

WICHA, M.S.; HUARD, T.K. Macrophages express cell surface laminin. **Exp Cell Res**, v. 143, p. 475-479, 1983.

WILLAMS, J.R.; GONG, H. Biological Activities and Syntheses of Steroidal Saponins: the Shark-Repelling Pavoninins. **Lipids**, v. 42, p. 77-86, 2007.

YAKUBENKO, V.P. et al. The role of integrin alpha D beta2 (CD11d/CD18) in monocyte/macrophage migration. **Exp Cell Res**, v. 314, p. 2569-2578, 2008.

YAMADA, K.M. Fibronectin peptides in cell migration and wound repair **J Clin Invest**, v. 11, p. 1507-1509, 2000.

ZHANG, H.Y. et al. Antithrombotic activities of aqueous extract from *Gardenia jasminoides* and its main constituent. **Pharm Biol**, v. 51, p. 221-225, 2012.

ZIMMERMANN, H.W.; TRAUTWEIN, C.; TACKE, F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. **Front Physiol**, v. 3, p. 1-18, 2012.