

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

GEISON VICENTE

POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DAS RAÍZES DE *Jungia sellowii* Less., NO MODELO AGUDO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS

**Florianópolis
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vicente, Geison

POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DAS RAÍZES DE *Jungia sellowii* Less., NO MODELO AGUDO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS / Geison Vicente ; orientadora, Tânia Silvia Fröde - Florianópolis, SC, 2017. 133 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Efeito anti-inflamatório. 3. Pleurisia. 4. NF- κ B, p38 MAPK. 5. Toxicidade. I. Silvia Fröde, Tânia . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA -PPGFAR**

Geison Vicente

**POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DAS RAÍZES DE *Jungia
sellowii* Less., NO MODELO AGUDO DA PLEURISIA INDUZIDA
PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada a
Banca Examinadora do
Programa de Pós-Graduação
em Farmácia da Universidade
Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre
em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde

Florianópolis
2017

Geison Vicente

POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DAS RAÍZES DE *Jungia sellowii* Less., NO MODELO AGUDO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS

Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos professores:

Banca examinadora:

Prof.(a). Dr(a). Lilian Sibelle Campos Bernardes (UFSC – Membro titular)

Prof.(a) Dr(a). Manuella Pinto Kaster (UFSC- Membro titular)

Prof.(a). Dr(a). Solange Lúci Blatt (UFSC – Membro titular)

Prof.(a). Dr.(a). Tânia Silvia Fröde (UFSC - Orientadora)

**Prof.(a) Dr(a). Tânia Beatriz Creezynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC**

Florianópolis, 06 de fevereiro de 2017.

Dedico esta dissertação aos meus avós (Lúcia e Walter) que sempre com muita sabedoria, dedicação e amor estiveram ao meu lado. Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Odi e Ingrid, meu infinito agradecimento por sempre me incentivarem e apoiarem a alcançar objetivos cada vez mais distantes, por sempre acreditarem em mim quando eu menos acreditava.

À minha irmã Dayane e meu irmão Leirson por me ajudar a superar os obstáculos, pela confiança e companheirismo.

Ao meu opa e oma Lúcia e Walter (in memorian) por me mostrarem o verdadeiro sentido do amor, por acreditarem em um mundo melhor e construir uma pessoa melhor a cada dia dentro de mim.

As minhas afilhadas Yasmin e Bianca, por sempre me proporcionarem momentos de alegria ao ver a vida com os olhos de uma criança.

Aos meus amigos, José, Elias, Ricardo e Fábio por me acompanhar em mais uma jornada, me apoiando e ajudando a superar todos os desafios encontrados mesmo em momentos difíceis com muito amor e paciência.

À minha orientadora Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde, por todo empenho, sabedoria e confiança depositado em todos esses anos de orientação, seu conhecimento me fez um profissional muito mais preparado à vida acadêmica e profissional. Ao professor Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, por sua ajuda e interesse em todos os momentos durante essa etapa, e por sua confiança e conhecimento depositado.

Aos meus amigos de laboratório Gustavo, Julia, Marina, Ziliani, Patricia, Rafael, Silvana, Bruno, Ana Beatriz, Marcus Vinicius, Antonio, Larissa, Yeo Jim, obrigado por todo apoio, por me ensinar muito do que sei hoje da vida acadêmica, pelos momentos de descontração, momentos de reflexão e por todo aprendizado da convivência diária.

À professora do departamento de Farmácia: Maique Weber Biavatti e suas alunas: Luise Azevedo Lima e Daniela, obrigado por realizarem todas as análises fitoquímicas necessárias e por toda paciência dispensada.

À Coordenadora do PGFAR, professora Dra. Tânia B. C. Pasa, à vice-coordenadora, Fabiola Monteiro, obrigado por toda a ajuda e interesse desde o início e durante o curso.

Ao fundo de apoio ao desenvolvimento do estado de Santa Catarina (FUMDES) e a todas as pessoas que participaram diretamente e indiretamente pela possibilidade do financiamento da bolsa de mestrado.

À UFSC, ao PGFAR, CNPq e CAPES agradeço por possibilitar a realização do presente trabalho com o financiamento necessário.

Aos amigos que fizeram parte de vários momentos em minha vida, ajudando e me guiando, e a todos aqueles que embora não citados tenham contribuído para a realização desta dissertação.

Meu muito obrigado!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê” (Arthur Schopenhauer).

RESUMO

Introdução: *Jungia sellowii* Less (*J. sellowii* L.) (Asteraceae) é um subarbusto encontrado no Sul e Sudeste do Brasil, conhecida como Jasmin do banhado ou Erva-de-Mula, sendo tradicionalmente utilizada na medicina popular como agente anti-inflamatório. **Objetivos:** 1) Avaliar o perfil tóxico do extrato bruto (EB) de *J. sellowii* L.; 2) Avaliar o efeito anti-inflamatório do EB, frações e compostos isolados de *J. sellowii* L., administrados por via intraperitoneal (i.p.), utilizando-se o modelo murino da pleurisia induzida pela carragenina. **Metodologia:** Raízes de *J. sellowii* L. foram extraídas com etanol e água para a obtenção do EB, este por sua vez foi particionado com diferentes solventes de ordem crescente de polaridade para a obtenção das frações hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), butanol (BuOH) e aquosa (Aq). Os compostos curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR) e o piptizol (Pip) foram isolados das frações BuOH e AcOEt, respectivamente. Camundongos albinos *Swiss*, fêmeas, (18-22 g) foram utilizados nos experimentos. A inflamação foi induzida por uma injeção intrapleural de carragenina (Cg 1%) segundo Saleh et al., 1996. Os parâmetros inflamatórios foram analisados no lavado da cavidade pleural e no pulmão dos camundongos após 4 h da administração da carragenina. Diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA), complementado pelo teste de Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. **Resultados:** Os resultados indicam a natureza não tóxica do EB até 2000 mg/kg, (i.p.) *in vivo*. Os animais tratados com EB, frações: Aq, BuOH, AcOEt e compostos isolados: CuR e Pip apresentaram um efeito anti-inflamatório diminuindo os parâmetros inflamatórios estudados no

modelo da pleurisia induzida pela Cg ($p < 0.05$). Além disso, os compostos CuR e Pip inibiram a fosforilação da subunidade p65 de NF- κ B (p-p65) e da proteína p38MAPK no pulmão dos camundongos ($p < 0,01$). **Conclusão:** O EB demonstrou uma atividade segura em doses altas *in vivo*. O efeito anti-inflamatório de *J. sellowii* L está relacionado com a diminuição de mediadores envolvidos na quimiotaxia e na exsudação, sendo o mecanismo de ação anti-inflamatório relacionado a inibição de vias de sinalização celular p65 de NF- κ B e p38MAPK.

Palavras-chave: *Jungia sellowii* Less., efeito anti-inflamatório, MPO, ADA, TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-12, óxido nítrico, NF- κ B, p38 MAPK, curcuhidroquinona *O*- β -Glicose, piptizol, toxicidade.

ABSTRACT

Introduction: *Jungia sellowii* Less (*J. sellowii* L.) (Asteraceae) is a subshrub found South and Southeast Brazil, popularly known as Swamp-Jasmine or Mule-Herb, used in folk medicine as an anti-inflammatory agent. **Objectives:** 1) To evaluate the toxic profile of the crude extract (EB) of *J. sellowii* L.; 2) To evaluate the anti-inflammatory effect of EB, fractions and compounds isolated from *J. sellowii* L., administered by intraperitoneal (i.p.) route, using the murine model of pleurisy induced by carrageenan. **Methodology:** *J. sellowii* L. roots were extracted with ethanol and water to obtain the EB, which in turn was partitioned with different solvents of increasing order of polarity to obtain the fractions hexane (Hex), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (AcOEt), butanol (BuOH) and aqueous (Aq). The compounds curcuhydroquinone O- β -glucose (CuR) and piptizol (Pip) were isolated from the BuOH and AcOEt fractions, respectively. Female albino Swiss mice (18-22 g) were used in the experiments. The inflammation was induced by an intrapleural injection of carrageenan (Cg 1%) according to Saleh et al., 1996. The inflammatory parameters were analyzed in the pleural cavity and lungs of mice 4 h after carrageenan administration. Statistical differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA), complemented by the Newman-Keuls test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. **Results:** The results indicate the non-toxic nature of EB up to 2000 mg / kg, (i.p.) *in vivo*. The animals pretreated with EB, fractions: Aq, BuOH, AcOEt and isolated compounds: CuR and Pip presented an anti-inflammatory effect by decrease the inflammatory parameters studied in the model of pleuresiy of Cg (p

<0.05). In addition, CuR and Pip inhibited the phosphorylation of the subunit p65 of NF- κ B (p-p65) and protein p38MAPK in the lungs of mice (p <0.01). **Conclusion:** EB demonstrated safe high-dose *in vivo* activity. The anti-inflammatory effect of *J. sellowii* L is related to the decrease of mediators in chemotaxis and exudation, and the anti-inflammatory mechanism of action is related to inhibition of p65 signaling pathways of NF- κ B and p38MAPK.

Keywords: *Jungia sellowii* Less., antiinflammatory effect, MPO, ADA, TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-12, nitric oxide, NF- κ B, p38 MAPK, curcuhydroquinone O- β -Glucose, piptizol, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Imagem da <i>Jungia sellowii</i> Less.	39
Figura 02 – Mecanismo de ação da mieloperoxidase (MPO) no processo inflamatório.	41
Figura 03 – Mecanismo de ação da adenosina desaminase (ADA) no processo inflamatório.	43
Figura 04 – Mecanismo de ação do óxido nítrico (NO) sintetizado por macrófagos via óxido nítrico sintase induzida (iNOS) no processo inflamatório.	45
Figura 05 – Esquema de ativação da via canônica do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e p38 MAPK em leucócitos.	51
Figura 06 – Vias de sinalização genômica e não-genômica dos glicocorticoides em células T.	53
Figura 07 – Perfil temporal do modelo da pleurisia induzida pela carragenina (Cg) em camundongos.	56
Figura 08 – Diagrama da sequência de obtenção do extrato bruto, frações, e compostos isolados das raízes de <i>Jungia sellowii</i> Less.	62
Figura 09 – UPLC da fração acetato de etila de <i>J. sellowii</i> L. em 285 nm. Numero 1: curcu hidroquinona <i>O</i> - β -glicose e número 2: α e β piptizol.	75
Figura 10 – UPLC da fração butanol de <i>J. sellowii</i> L. a 280 nm. Número 1: curcu hidroquinona <i>O</i> - β -glicose e número 2: α e β piptizol.	76
Figura 11 – Estrutura química do composto isolado a partir da fração acetato de etila das raízes de <i>Jungia sellowii</i> Less.	76
Figura 12 – Estrutura química do composto isolado a partir da	77

fração butanol das raízes de *Jungia sellowii* Less.

Figura 13 – Viabilidade celular do EB de *J. sellowii* L., sobre macrófagos J774 no teste de MTT. 78

Figura 14 – Curva de sobrevivência a diferentes doses do EB de *J. sellowii* em camundongos. 79

Figura 15 – Efeito do extrato bruto (EB) (25 - 200 mg/kg) obtido das raízes de *Jungia sellowii* Less., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. 82

Figura 16 – Efeito da fração aquosa (Aq) (1 - 25 mg/kg) obtida das raízes de *Jungia sellowii* Less., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. 83

Figura 17 – Efeito da fração butanol (BuOH) (10 - 50 mg/kg) obtida das raízes de *Jungia sellowii* Less., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. 84

Figura 18 – Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) (1 - 25 mg/kg) obtida das raízes de *Jungia sellowii* Less., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. 85

Figura 19 – Efeito do composto isolado curcu-hidroquinona *O*- β -glicose (CuR) (1 - 5 mg/kg) obtido da fração butanol de *Jungia* 86

sellowii Less., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.

Figura 20 – Efeito do composto isolado piptizol (Pip) (0,5 – 5 mg/kg) obtido da fração acetato de etila de *Jungia sellowii* Less., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.

87

Figura 21 – Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), compostos curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre as concentrações da enzima mieloperoxidase (MPO).

89

Figura 22 – Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), compostos curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre as concentrações da enzima adenosina desaminase (ADA).

90

Figura 23 – Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 10 mg/kg), fração

91

acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), compostos curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrado por via intrapleural (i.pl.) sobre as concentrações de nitrito/nitrato (NO_x.)

Figura 24 – Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), compostos curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre as concentrações do fator de necrose tumoral alfa (TNF α).

92

Figura 25 – Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), compostos curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre as concentrações do interferon gamma (IFN γ).

93

Figura 26 – Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), compostos curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) de *Jungia sellowii* Less., administrados por via

94

intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre as concentrações de interleucina 6 (IL6).

Figura 27 – Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), compostos curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre as concentrações de interleucina 12 (IL12).

95

Figura 28 – Efeito dos compostos curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2.5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg), isolados da fração butanol e acetato de etila de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre a fosforilação da proteína p65 do NF- κ B (p-p65-NF κ B).

96

Figura 29 – Efeito dos compostos curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2.5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg), isolados da fração butanol e acetato de etila de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre a fosforilação da proteína p38 MPK (p-p38 MPK).

97

Figura 30 – Esquema de conclusão do efeito anti-inflamatório de *Jungia sellowii* Less sobre os mediadores inflamatórios estudados.

107

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Limites de detecção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-12 por citometria de fluxo CBA. **71**
- Tabela 2 – Coeficientes de variação (CV) intraensaios e interensaios das citocinas TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-12 por citometria de fluxo CBA. **71**
- Tabela 3 - Estudo da curva dose resposta e curva tempo resposta no modelo da pleurisia induzida pela carragenina. **88**

LISTA DE ABREVIATURAS

A1	Receptor A1 de adenosina
A2A	Receptor A2A de adenosina
A2B	Receptor A2B de adenosina
A3	Receptor A3 de adenosina
A3	Receptor A3 de adenosina
AcOEt	Fração acetato de etila
ADA	Adenosina-desaminase
AP-1	Proteína ativadora-1
APC	Células apresentadoras de antígeno
Aq	Fração aquosa
ASK-1	Quinase reguladora de sinais apoptóticos-1
ATF	Fator de ativação de transcrição
ATF-2	Fator de ativação 2 de transcrição
BAFFR	Fator de ativação de células B
BALB/c	Linhagem de camundongos albinos
Breg	Células B regulatórias
BuOH	Fração butanol
C57BL/6	Linhagem de camundongos black 6
CBA	Cytometric Bead Array
CC	Concentração citotóxica
CCL3	Quimiocina C-C ligante 3
CCL4	Quimiocina C-C ligante 4
CD11b	Proteína de superfície envolvida na adesão e migração celular
CD4+	Linfócito T auxiliador
CD40	Cluster of differentiation 40
CD40L	Ligante de superfície de células B cluster of differentiation 40
CD66b	Proteína moduladora da adesão de neutrófilos
CD8+	Linfócito T citotóxico
CD80	Molécula co-estimuladora cluster of differentiation 80
CD86	Molécula co-estimuladora cluster of differentiation 86
CEUA	Comitê de ética do uso de animais
c-Fos	Membro da família Fos
Cg	Carragenina
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média

c-Jun	Membro da família Jun
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
c-Rel	Membro da família do NF- κ B
cRel	Membro da família NF- κ B
CuR	Curcuhydroquinona <i>O</i> - β -glicose
CXCL10	Quimiocina C-X-C ligante 10
CXCL2	Quimiocina inflamatória de recrutamento de polimorfonucleares
CXCL8	Quimiocina produzida por macrófago
CXCR1	Receptor de quimiocina 1
DCM	Fração diclorometano
Dexa	Dexametasona
DL50	Dose Letal que leva a morte de 50% de camundongos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EB	Extrato bruto
EIE	Enzimaimunoensaio
ERK	Quinase reguladora extracelular
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
E-Selectina	Molécula de adesão de neutrófilos
FID	Dados adquiridos em equipamento
Fos	Subunidade do heterodímero AP-1
FosB	Membro da família Fos
Fra-1	Membro da família Fos
Fra-2	Membro da família Fos
Fyn	Proteína tirosina quinase da família Src
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago e granulócitos
GR	Receptor de glicocorticoide
GRE	Elementos responsivos aos glicocorticoides
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Hex	Fração hexano
HMBC	Correlação de ligações múltiplas heteronucleares
HT	Hematócrito

i.p.	Via intraperitoneal
i.pl.	Via intrapleural
i.v.	Via intravenosa
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulinas
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IKK	Complexo da quinase I κ B
IKK1	Quinase envolvida na ativação de NF-K β
IKK α	Subunidade catalítica do complexo da quinase I κ B tipo α
IKK β	Subunidade regulatória do complexo da quinase I κ B tipo β
IKK γ	Subunidade catalítica do complexo da quinase I κ B tipo γ
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-11	Interleucina-11
IL-12	Interleucina-12
IL-12R	Receptor de IL-12
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-15
IL-17	Interleucina-17
IL-1R	Receptor de interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-21	Interleucina-21
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-6R	Receptor de IL-6
IP-10	Proteína induzida por IFN- γ
I κ B	Proteína inibitória de NF-kB
I κ B α	Proteína inibitória de NF-kB tipo alfa
I κ B β	Proteína inibitória de NF-kB tipo beta
<i>J. sellowii</i> L.	<i>Jungia sellowii</i> Less
JAK	Janus quinase
JNK	Quinases c-Jun N-terminal

JRLE	Extrato metanólico obtido das folhas de <i>Jungia rugosa</i>
Jun	Subunidade do heterodímero AP-1
JunB	Membro da família Jun
JunD	Membro da família Jun
Lck	Proteína tirosina quinase específica de linfócito
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacarídeos
LTB4	Leucotrieno B4
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito-1
mGR	Receptor de membrana de glicocorticoide
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade tipo II
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófago-1
MKP-1	Proteína quinase fosfatase-1 ativada por mitógenos
MPKK	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno
MPKK	Proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno
MPO	Mieloperoxidase
MTT	3-(4,5-dimethylazol-Zyl) -2-5-brometo de difeniltetrazólio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NEMO	Subunidade catalítica do complexo da quinase IκB tipo γ
NF-Kb	Fator de transcrição nuclear kappa B
NF-κB1	Membro da família de NF-κB
NF-κB2	Membro da família de NF-κB
NK	Célula Natural Killer
NO	Óxido nítrico
NO2-	Nitrito
NO3-	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSe	Óxido nítrico sintase endotelial
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
NOSn	Óxido nítrico sintase neuronal
NOx	Metabólitos do óxido nítrico (nitrito/nitrato)
O2-	Anion superóxido

O2.	Radical ânion superóxido
OH-	Radical hidroxila
ONOO-	Peroxinitrito
OVA	Ovalbumina
p100	Precursor de p52
p50	Subunidade de NF-κB
p52	Membro da família de NF-κB
p65	Subunidade de NF-κB
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Proteína C reativa
PDA	Detector de diódos
PGE2	Prostaglandina E2
Pip	Piptizol
PLA2	Fosfolipase A2
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANTES	Quimiocina secretada, expressa e regulada sob ativação de linfócitos T
RBC	Eritrócitos
RDW	Distribuição de glóbulos vermelhos
RelA	Membro da família NF-κB (p65)
RelB	Membro da família NF-κB
RMN	Ressonancia magnética nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SARA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SCF	Fator de célula tronco
STAT4	Sinal transdutor e ativador de transcrição 4
TAK-1	TGF-β quinase ativada-1
TcR	Receptor de células T
Th1	Linfócito T helper 1
Th17	Linfócito T helper 17
Th2	Linfócito T helper 2
TLR4	Receptor tipo toll 4
TLRs	Toll-like
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPA	Tetradecanoylphorbol-13-Acetate
UPLC	Ultracromatografia de alta eficiencia
UV	Radiação ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
VCM	Volume corpuscular médio
WBC	Glóbulos brancos

WHO

World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	345
1.1 PLANTAS MEDICINAIS	35
1.2 Gênero <i>Jungia</i>	37
1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO	39
1.3.1 ENZIMAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO	40
1.3.1.1 MIELOPEROXIDASE	40
1.3.1.2 ADENOSINA DESAMINASE	42
1.3.2 ÓXIDO NITRICO	43
1.3.3 CITOCINAS	45
1.3.4 FATORES DE TRANSCRIÇÃO	49
1.3.4.1 Fator de transcrição nuclear kappa B (NF-KB)	49
1.3.4.2 PROTEINAS QUINASES ATIVADAS POR MITOGENOS (MAPK) p38	50
1.4 FÁRMACO ANTI-INFLAMATÓRIO	52
1.5 MODELOS DE INFLAMAÇÃO	53
1.6 Hipótese	57
2. OBJETIVOS	59
2.1 OBJETIVO GERAL	59
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
3. METODOLOGIA	61
3.1 MATERIAL VEGETAL	61
3.1.1 Obtenção do material vegetal	61
3.1.2 Preparo dos extratos e particionamento	61
3.1.3 Análise do perfil das frações acetato de etila e butanol por UPLC	62
3.1.4 Elucidação Estrutural	63
3.2 EXPERIMENTOS IN VITRO	63
3.2.1 Teste de citotoxicidade	63
3.3 EXPERIMENTOS IN VIVO	64
3.3.1 Delineamento do estudo	64
3.3.2 Animais	64
3.3.3 Procedimento anestésico	64

3.3.4 Eutanásia dos animais _____	65
3.3.5 Toxicidade aguda _____	65
3.3.6 Pleurisia induzida pela carragenina (Cg) em camundongos _____	66
3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL _____	66
3.5 TÉCNICAS UTILIZADAS _____	67
3.5.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos _____	67
3.5.2 Determinação dos parâmetros hematológicos _____	68
3.5.3 Determinação das proteínas da exsudação _____	68
3.5.4 Determinação das concentrações de mieloperoxidase (MPO) _____	69
3.5.5 Determinação das concentrações de adenosina-desaminase (ADA) _____	69
3.5.6 Quantificação das concentrações dos metabólitos do óxido nítrico (NO _x) _____	70
3.5.7 Determinação das concentrações de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-12 _____	70
3.5.8 Avaliação da fosforilação de p65 (p-p65 NF- κ B) _____	71
3.5.9 Avaliação da proteína p38 fosforilada (p38 MAPK) _____	72
3.6 Fármacos e reagentes _____	72
4. RESULTADOS _____	75
4.1 Cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC-PDA) de <i>J. sellowii</i> L., frações acetato de etila e butanol. _____	75
4.2 Determinação estrutural dos constituintes de <i>Jungia sellowii</i> Less _____	76
4.3 Teste de citotoxicidade _____	77
4.4. Teste de toxicidade aguda _____	78
4.5 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E PROTEÍNAS DO ESUDATO _____	79
4.6 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DA MIELOPEROXIDASE _____	88

4.7 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DA ADENOSINA DESAMINASE	89
4.8 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NITRITO/NITRATO)	90
4.9 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-12.	91
4.10 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE A FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA p65 (p-p65-NF- κ B).	95
4.11 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE A FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA MPK (p-p-38).	96
5. DISCUSSÃO	99
6. CONCLUSÃO	107
7. REFERÊNCIAS	109
ANEXO I	125
APÊNDICE	127

1. INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

O termo “produtos naturais” é definido como uma classe de compostos químicos isolados de plantas, bactérias, minerais e matérias orgânicas (SHARMA; GUPTA, 2015). A utilização de plantas para fins medicinais é uma prática muito antiga e ainda muito comum nos dias de hoje em diversas partes do mundo, como na Ásia (GROVER; YADAV; VATS, 2002; DURAI PANDIYAN; AYANNAR; IGNACIMUTHU, 2006), África (JURG; TOMAS; PIVIDAL, 1991; KHALID et al., 2012) e na América do Sul (BOLZANI et al., 2012; CARVALHO et al., 2014).

Assim, esses novos produtos naturais descobertos são fontes de protótipos com atividade biológica, principalmente devido à variedade de metabólitos secundários presentes nestas plantas, tais como: glicosídeos, taninos, flavonoides, alcaloides, esteroides, cujas estruturas são úteis no tratamento de uma diversidade de doenças, incluindo as de caráter inflamatório (NGO; OKOGUN; FOLK, 2013; SHARMA; GUPTA, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 60% da população mundial utiliza principalmente as plantas para os cuidados primários de saúde e muitas destas espécies utilizadas ainda não possuem sua atividade biológica comprovada (WHO, 2010; BRUSOTTI et al., 2015).

O conhecimento sobre tais produtos naturais é fonte de descoberta para novos tratamentos e tem delineado a produção de diversos medicamentos utilizados no mundo. Alguns exemplos relevantes são: a quelina, isolada de *Ammi visnaga* L. que promoveu o desenvolvimento da Cromolina (sob a forma de cromoglicato de sódio), um broncodilatador amplamente utilizado em doenças respiratórias (ZHANG et al., 2015). Outro exemplo é a *Galega officinalis* L., pelo qual se obteve a galegina que foi utilizada na síntese da metformina e de outros hipoglicemiantes utilizados amplamente no mundo para o tratamento do diabetes (RIO et al., 2015). Ainda, como derivados de plantas pode-se citar a papaverina obtida de *Papaver somniferum*, que serviu de base para o desenvolvimento do fármaco verapamil utilizado no tratamento da hipertensão (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001), além dessa planta ser reconhecida como fonte de analgésicos opióides tais como a morfina e a codeína (BUSS; WAIGH, 1995; DA-CHENG et al., 2015). Outro exemplo da originalidade estrutural dos produtos

naturais é o taxol, um diterpeno da classe dos taxanos, com estrutura química complexa, isolado das cascas de *Taxus brevifolia* em 1971 por Monroe Wall e Mansukh Wani amplamente utilizado como antineoplásico (BARREIRO; FRAGA, 2015). Porém o melhor exemplo é o citado pela pesquisadora chinesa Tu Youyou na descoberta e no desenvolvimento de fármacos antimaláricos, particularmente a artemisinina, levando ao prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 2015 (MILLER; SU, 2011; TANGNITIPONG et al., 2012; HAYNES et al., 2013; NOBEL PRIZE, 2015).

De uma forma geral o Brasil é o país de maior biodiversidade no mundo compreendendo mais de 45.000 espécies de plantas descritas (cerca de 20-22% do total existente no planeta). Além disso, a população brasileira tem uma longa tradição no uso de plantas medicinais para o tratamento de diferentes doenças de caráter agudo e crônico. Nos últimos 28 anos o Brasil foi um dos países com o maior número de publicações em relação a plantas medicinais, com 34.614 mil. Porém ainda a segurança (toxicologia), estudos de farmacocinética, e os ensaios clínicos são escassos, principalmente, com relação aos compostos isolados que servem de base para novos fármacos (CRAGG; NEWMAN, 2013; DUTRA et al., 2016).

Atualmente apenas um produto fitoterápico, com o nome Acheflan®, obtido a partir de *Cordea verbenacea* está entre os 20 fitoterápicos mais vendidos no Brasil (US\$ 11.06 milhoes - 2014), confirmando que a investigação em plantas medicinais no Brasil permanece ainda restrita à academia, com alguns escassos exemplos de parceria com as indústrias farmacêuticas. Sendo assim os derivados de plantas no Brasil (fitoterápicos) são uma minoria no mercado, o que representa menos de 5% de todos os medicamentos comercializados atualmente (DUTRA et al., 2016; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Com o intuito de fornecer um embasamento científico aos conhecimentos oriundos da medicina tradicional, muitos estudos visam encontrar substâncias que possam ser candidatas a fontes de obtenção de novas estruturas químicas. Assim, tais substâncias possam ser de interesse à indústria farmacêutica, devido às suas atividades farmacológicas específicas, contribuindo para a produção de novos produtos farmacêuticos, voltados principalmente para o tratamento de doenças de caráter inflamatório (LIMA et al., 2011, CRAGG; NEWMAN, 2013; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

Portanto, informações e investimentos nos conhecimentos tradicionais de grupos étnicos, com a formação de recursos humanos para a descoberta de novos produtos a partir de plantas utilizadas na

medicina popular e a aproximação entre a academia e indústria para o desenvolvimento tecnológico se torna fundamental em favor das populações regionais. Além disso, estes estudos podem contribuir significativamente na pesquisa e no desenvolvimento do país, principalmente pela necessidade de novos agentes anti-inflamatórios mais eficazes, capazes de atuarem especificadamente e com menores efeitos colaterais em doenças cujo tratamento convencional ainda não é adequado (GOSSLAU et al., 2011).

1.2 GÊNERO *JUNGIA*

Jungia (Asteraceae) é um genero descrito para ervas perene, arbustivas e presente nas Américas do Norte, Central e do Sul, incluindo o Brasil. A espécie *Jungia sellowii* Less. (Figura 01) pode ser encontrada desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, além de Goiás e no oeste de Santa Catarina (MARCHANT et al., 2002). Popularmente a espécie é conhecida como Jasmim do banhado, Erva-de-mula ou Erva-de-Bugre ocorrendo em ambientes de orlas de Florestas e trilhas e em bosques de pinhais alterados, em solos muito variáveis, mas com preferência por ambientes mais úmidos (MONGE, 2010).

Diversas espécies deste gênero são utilizadas na medicina popular na forma de infusão ou decocção, administrado por via oral para o tratamento de inflamações do trato urinário, tonsilites, úlceras estomacais, inflamações no fígado e rins. Ainda as folhas são utilizadas na forma de infusão para desinfectar cortes e feridas externas e também visando tratar inflamações como hemorroidas (HAMMOND et al., 1998; DE-LA-CRUZ; VILCAPOMA; ZEVALLOS, 2007; REHECHO et al., 2011).

Muitos dos efeitos farmacológicos de algumas espécies do gênero já foram descritos na literatura, como é o caso do extrato metanólico (JRLE) obtido das folhas de *Jungia rugosa*. Este estudo conduzido por WILCHES e colaboradores (2015) demonstrou a atividade anti-inflamatória da planta tanto em modelo de inflamação aguda (edema de orelha induzido por óleo de cróton, em camundongos e edema de pata induzido por carragenina, em ratos) como também em modelos crônicos (formação de granuloma, em camundongos). Em ambos os modelos a *J. rugosa* demonstrou importante atividade anti-inflamatória corroborando seu uso na medicinal popular.

CASADO e colaboradores (2010) da mesma forma demonstraram os efeitos anti-inflamatório e antioxidante da espécie *Jungia paniculata* em testes *in vitro* através da inibição da fosfolipase

A2 (PLA2) *e in vivo*, utilizando dois modelos de edema: edema de pata induzido por carragenina em ratos e edema de orelha induzido por 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate (TPA), em camundongos. Estes efeitos observados foram correlacionados com a presença de polifenóis e flavonoides presentes na planta.

Além disto, já foi relatado o uso da espécie *Jungia polita* na medicina popular como agente depurativo do sangue (GOLENIOWSKI et al., 2006).

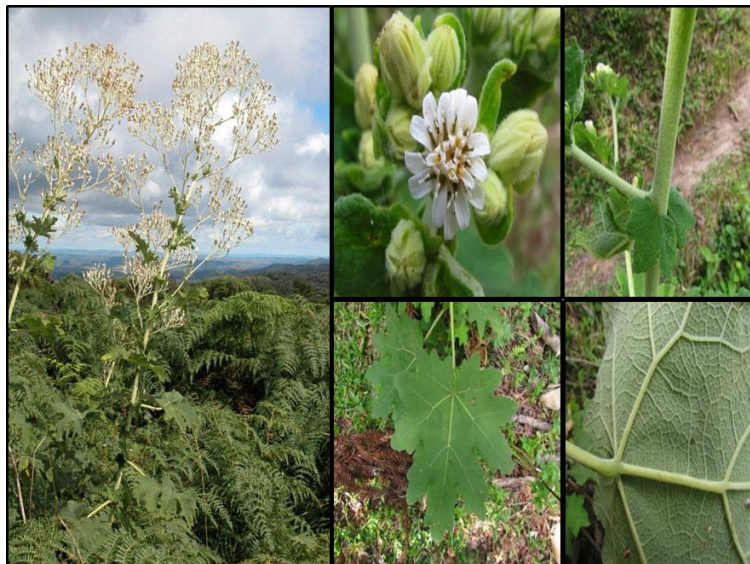
Outras espécies deste gênero como a *J. herzogiana*, *J. malvaefolia*, *J. seteriana*, *J. stuebelii* e *J. spectabilis*, já foram fitoquimicamente estudadas. A análise destas espécies revelou a presença de flavonoides (D'AGOSTINO et al., 1995), poliacetilenos (BOHLMANN; ZDERO, 1977; BOHLMANN et al., 1984), derivados terpenoides e sesquiterpenos (BOHLMANN; ZDERO, 1977; 1978; BOHLMANN et al., 1983; YBARRA et al., 1992), além de derivados cumarínicos (BOHLMANN; ZDERO; LE VAN, 1979), sendo os poliacetilenos e os sesquiterpenos dois tipos de metabólitos secundários biologicamente ativos presentes na família Asteraceae.

Já em relação à espécie *Jungia sellowii* Less a análise recente das folhas demonstrou a presença de três novos glicosídeos sesquiterpenicos primeiramente isolados, incluindo o primeiro glicosídeo lactânico trixano isolado da espécie (AZEVEDO et al., 2016).

Todos esses compostos têm recebido maior atenção nos últimos anos devido ao fato de demonstrarem uma atividade anti-inflamatória, como exemplo em modelos de inflamação pulmonar induzido por lipopolissacarídeo (LPS), promovendo a diminuição da ativação de fatores de transcrição nuclear, como o fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B) ou mesmo a diminuição da ativação na via das cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (FARAG; PARÉ, 2013; JIANG et al., 2013; XU et al., 2013).

No entanto, atualmente não existe nenhum estudo direcionado em relação às atividades biológicas das raízes de *Jungia sellowii* Less., as quais é utilizada tradicionalmente pela população. Desta forma, este trabalho se propôs a avaliar a toxicidade da planta e seu efeito anti-inflamatório, bem como identificar quais estruturas químicas poderiam ser responsáveis por este efeito, além de indicar um possível mecanismo de ação farmacológica para esta atividade. Estas informações são de relevância para o embasamento científico popular, além do desenvolvimento de novos fitoterápicos ou fitofármacos com atividade anti-inflamatória em doenças cujo tratamento convencional ainda não é efetivo.

Figura 01. Imagem de *Jungia sellowii* Less



Fonte: <https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnolio-phyta/asteraceae/jungia-sellowii>. Acesso em 07 de abril de 2016.

1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação pode ser considerada um mecanismo fisiológico do sistema imune que envolve uma série de eventos desencadeados via lesão tecidual ou estímulos antigênicos (HEADLAND; NORLING, 2015). Essa resposta pode ser definida como uma cascata de eventos de ativação do sistema vascular e da celularidade, pelo qual ocorre a liberação excessiva de mediadores, aumento da permeabilidade microvascular seguido pela transmigração e infiltração de células no local, apoptose celular, angiogênese e o remodelamento tecidual caso a inflamação não seja cessada (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; HEADLAND; NORLING, 2015).

Durante a resposta imune ocorre a ativação de determinados tipos de células que são residentes ou foram recrutadas para o tecido lesionado. Dentre estas pode-se destacar os mononucleares (monócitos e

linfócitos) e os polimorfonucleares (neutrófilos) (HEADLAND; NORLING, 2015).

Nesse contexto a complexidade desta resposta depende de mecanismos que atuam em diferentes etapas, tais como a ativação destas células, a regulação das vias de sinalização intracelular e o controle da expressão gênica de mediadores pró ou anti-inflamatórios (MEDZHITOV; HORNG, 2008). Os eventos podem ser desencadeados por diferentes estímulos, como aqueles associados à origem infecciosa ou não infecciosa, cada um relacionado a um tipo de resposta tecidual. Desta forma, a amplificação desta resposta inflamatória depende do agente lesivo, da persistência do agente agressor, das características do tecido e da coexistência de outras comorbidades (MEDZHITOV; HORNG, 2009).

Sendo assim, na clínica, a inflamação aguda geralmente está relacionada com doenças do tipo metabólicas como o diabetes, a doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico (LES) e doenças de origem neurogênica e degenerativa como: Alzheimer, Parkinson e epilepsia (DONATH, 2013; LONTCHI-YIMAGOU et al., 2013; AMOR et al., 2014).

Neste cenário, podemos destacar algumas enzimas pró-inflamatórias específicas e importantes que fazem parte desse processo de iniciação e perpetuação da resposta inflamatória.

1.3.1 ENZIMAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO

1.3.1.1 MIELOPEROXIDASE

Entre as enzimas relacionadas à inflamação destaca-se a mieloperoxidase (MPO) (BRADLEY et al., 1982; ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). A MPO é uma peroxidase abundante nos grânulos azurófilos primários dos neutrófilos que promove a liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO).

Inicialmente a partir da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) ocorre a conversão do oxigênio molecular em ânion superóxido e então a enzima superóxido dismutase converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio pela ação da MPO é convertido em ácido hipocloroso o qual possui importante ação microbicida (Figura 02).

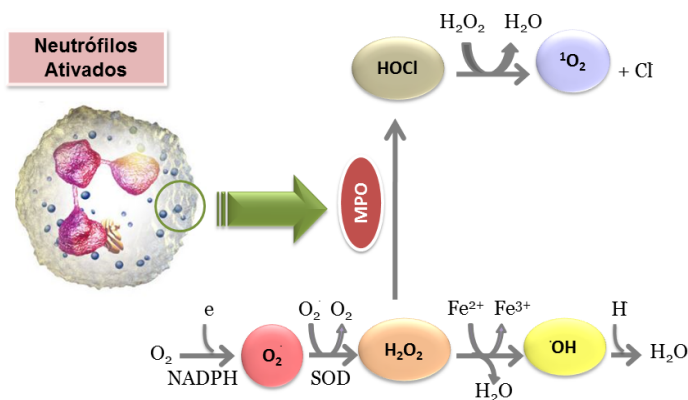
Porém quando ocorre a liberação excessiva de ácido hipocloroso no espaço extracelular, ocorre a produção de ERO e

espécies reativas de nitrogênio (ERN) em grande quantidade que por sua vez causam a oxidação de lipídeos, de ácido desoxirribonucleico (DNA) e de lipoproteínas promovendo dano tecidual e celular local (DAI; HARADA; TAKAMATSU, 2015; ODOBASIC; KITCHING; HOLDSWORTH, 2016).

Este processo ocorre em várias doenças onde há o acúmulo de neutrófilos com intensa atividade de MPO, como exemplo na asma neutrofílica, na doença pulmonar obstrutiva crônica – (DPOC) ou em outras lesões pelo qual ocorre a injúria pulmonar. Além disso, a MPO pode ser detectada em placas de aterosclerose, nas doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson, Esclerose Múltipla e no líquido sinovial de pacientes com Artrite Reumatóide mostrando seu papel em diversas patologias (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010; NAUSEEF, 2014).

Assim a avaliação da atividade de MPO durante o processo inflamatório é uma ferramenta importante e útil da presença de neutrófilos ativados no sítio inflamatório, sendo encontrada em doenças onde a neutrofilia e por consequência o alto dano local está presente (FAITH et al., 2008).

Figura 02 - Mecanismo de ação da mieloperoxidase (MPO) no processo inflamatório.



(ARNHOLD; FLEMMIG, 2010; NAUSEEF, 2014)

A MPO é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em ácido hipocloroso (HClO), um composto com ação antimicrobiana e importante durante a resposta imune inata. Fonte: Adaptado de NAUSEEF, 2014. Acesso em 10/10/2016.

1.3.1.2 ADENOSINA DESAMINASE

Outra enzima importante no processo inflamatório é a adenosina-desaminase (ADA). Esta é uma enzima envolvida no metabolismo das purinas, catalisando a desaminação hidrolítica da adenosina ou 2-desoxiadenosina em inosina e amônia (ANTONIOLI et al., 2013, CORTÉS et al., 2015). Os macrófagos ativados são as principais fontes de adenosina extracelular, entretanto, neutrófilos e células endoteliais também liberam grandes quantidades de adenosina em sítios inflamatórios regulando assim a atividade da enzima ADA e a concentração extracelular do nucleosídeo adenosina (ANTONIOLI et al., 2013).

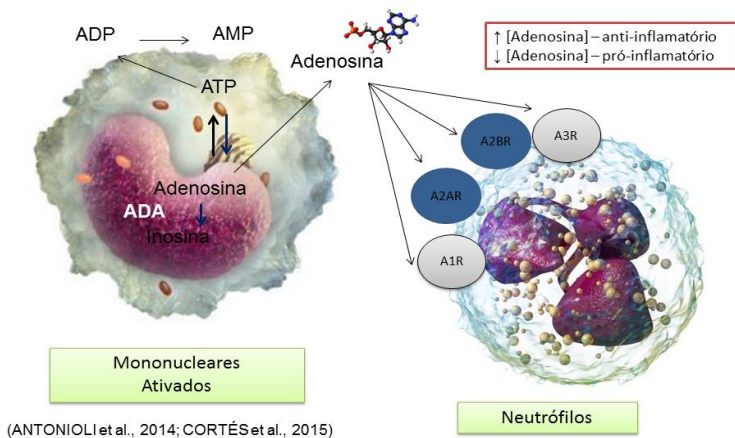
A adenosina é uma substância que pode apresentar atividade pró ou anti-inflamatória dependendo do microambiente e do tipo de receptor celular presente. Os receptores de adenosina pertencem à família de receptores acoplados à proteína G e são classificados em quatro diferentes subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Dentre estes receptores, A₁ e A₃ possuem alta afinidade por adenosina, enquanto o receptor A_{2A} e A_{2B} apresentam baixa afinidade (ANTONIOLI et al., 2014). Os receptores de adenosina são distribuídos e expressos em diversas células, como: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos T e B, macrófagos, células dendríticas, células do epitélio brônquico, fibroblastos e células endoteliais. (CORTÉS et al., 2015) (Figura 03).

A ativação dos receptores de adenosina pode promover diversos efeitos biológicos, os quais algumas vezes são antagônicos. No pulmão a diminuição da atividade da ADA promove o aumento das concentrações de adenosina extracelular. A adenosina extracelular é capaz de se ligar em receptores A_{2A}, A_{2B} e A₃ de neutrófilos inibindo a transmigração de neutrófilos para o local da inflamação mediado pela diminuição da expressão da molécula intercelular 1 (ICAM-1) do endotélio. Este efeito ainda permite a diminuição da produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 12 (IL-12) promovendo consequente diminuição da lesão tecidual e do recrutamento de neutrófilos (BARLETTA; LEY; MEHRAD, 2012; ANTONIOLI et al., 2014).

O estudo realizado por YAGO e colaboradores (2015), demonstrou o efeito anti-inflamatório de um agonista de receptores A_{2A} (ATL313) na inibição de moléculas de adesão do tipo integrinas e na modulação da adesão de neutrófilos no sítio inflamatório. Este efeito

demonstra o papel eficiente dos receptores de adenosina no controle da inflamação pulmonar.

Figura 03 - Mecanismo de ação da adenosina desaminase (ADA) no processo inflamatório.



A atividade da enzima ADA é destacada por aumentar e promover a catabolização do nucleosídeo adenosina. Desta forma, a inibição da atividade da ADA promove um aumento na biodisponibilidade da adenosina extracelular, que nestas condições interage com receptores A2A de neutrófilos promovendo um efeito de inibição da adesão, transmigração promovendo um efeito anti-inflamatório. Fonte: Adaptado de ANTONIOLI et al., 2014 e CÓRTEZ et al., 2015. Acesso em 23/09/2016.

1.3.2 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que regula as funções celulares em condições fisiológicas, incluindo: relaxamento vascular, inibição da agregação plaquetária, a neurotransmissão, atividades antimicrobianas e atividades antitumorais, entre outros (PREDONZANI et al., 2015, WALTZ et al., 2015).

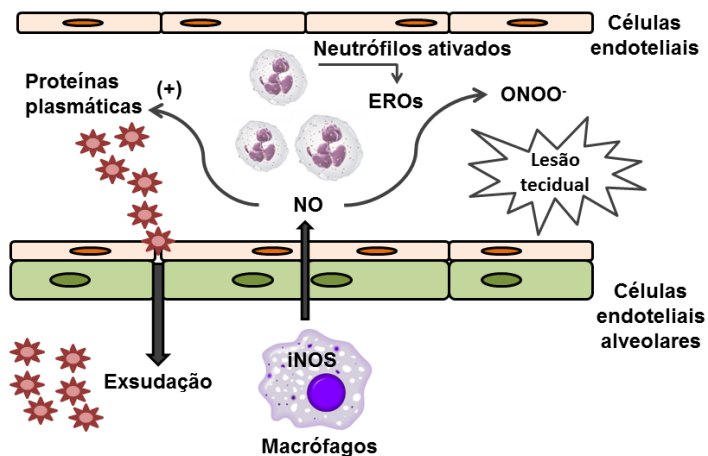
O NO é sintetizado a partir do metabolismo do aminoácido L-arginina mediado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). A oxidação da porção N-terminal do aminoácido libera NO e L-citrulina. (PREDONZANI et al., 2015, WALTZ et al., 2015).

A síntese de NO depende da atividade da NOS. Esta enzima apresenta três isoformas: NOS neuronal (NOS_n ou NOS1), NOS endotelial (NOS_e ou NOS3) e NOS induzida (NOS_i ou NOS2). As isoformas NOS_n e NOS_e produzem pequenas quantidades de NO envolvidas na manutenção das funções fisiológicas do organismo, por isso são ditas isoformas constitutivas. Já a expressão de NOS_i resulta na produção/liberação de grandes quantidades de NO e está associada a condições patológicas e a injúria (BOGDAN, 2015) (Figura 04).

Em doenças inflamatórias respiratórias é observado o aumento da expressão da NOS_i, através das concentrações elevadas de nitrito/nitrato e da proteína surfactante (proteína SP-a) encontrada no lavado broncoalveolar de pacientes com síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), demonstrando nesse caso o papel central da NOS na formação de edema (CARNESECCHI; PACHE; BARAZZONE-ARGIROFFO, 2012). Ainda é observado concentrações elevadas de NO nos pacientes com LES, diabetes, asma e doença inflamatória intestinal (WALTZ et al., 2015). Já a deficiência deste mediador está associada a doenças vasculares, tais como trombose e estenose (FRANÇA-SILVA et al., 2014).

Diferentemente das outras isoformas, a NOS_i pode ser produzida por vários tipos de células, tais como macrófagos, neutrófilos, células dentríticas, células endoteliais e células epiteliais (BOGDAN, 2015). Assim, estudos demonstram que tanto a NOS_e quanto a NOS_i são responsáveis pela reação de estresse oxidativo que ocorre no pulmão, levando a um aumento da liberação de mediadores e citocinas inflamatórias no local. Por vez a deficiência do gene NOS_e ou NOS_i não acarreta uma melhora significativa na sobrevida de camundongos, em modelo de injúria pulmonar aguda e sepse, demonstrando que a abordagem da diminuição das concentrações de nitrito/nitrato no pulmão é a mais eficaz (LANGE et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2010).

Figura 04 - Mecanismo de ação do óxido nítrico (NO) sintetizado por macrófagos via óxido nítrico sintase induzida (NOSi) no processo inflamatório.



(CARNESECCHI; PACHE; BARAZZONE-ARGIROFFO, 2012)

O NO promove o aumento da permeabilidade vascular, ativação celular, regula a liberação de citocinas por neutrófilos ativados, induz a liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) como peroxinitrito, ânion peróxido e nitrosotíóis. Fonte: Adaptado de BOGDAN, 2015. Acesso em 10/10/2016.

1.3.3 CITOCINAS

Assim como o óxido nítrico, outros mediadores são liberados durante o processo inflamatório, entre eles destacam-se as citocinas e as quimiocinas. As citocinas atuam como mediadores e moduladores da resposta imunológica, participam no desenvolvimento hematopoiético e atuam na comunicação celular. Além disso, estas citocinas também participam de respostas do hospedeiro a agentes infecciosos e estímulos inflamatórios interagindo sinergicamente ou de forma antagonica (STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015).

As citocinas desempenham seu papel através da ativação de receptores específicos na célula alvo, entre os exemplos clássicos temos os receptores do tipo Toll-like (TLRs) localizados na membrana de diversas células. As citocinas também podem desempenhar seu papel ao se ligar a receptores localizados no interior das células, mais especificadamente no citoplasma celular (TURNER et al., 2014).

As citocinas podem ser consideradas moléculas pleiotrópicas no que se refere aos seus efeitos fisiológicos. Assim os efeitos frequentemente dependem das concentrações relativas de várias citocinas e isso ilustra a importância em reconhecer a fisiologia através de redes conexas devendo ser necessário mensurar múltiplas citocinas numa única amostra para reconhecer a fisiopatologia de determinada doença (BALKWILL; BURKE, 1989;. PARK et al., 2001).

A produção de citocinas é muitas vezes transitória e rigorosamente regulada, devido à alta atividade da maioria delas e a sua concentração homeostática nos fluidos corporais geralmente é baixa (picomolar). No entanto, se necessário, a concentração pode aumentar até 1.000 vezes em resposta a um agente infeccioso ou lesivo. Em concentrações elevadas as citocinas e as quimiocinas levam a ativação da transcrição de fatores nucleares como o NF- κ B que está associado à inflamação e a progressão da doença. Por estemotivo, as citocinas são importantes proteínas amplamente utilizadas como biomarcadores para compreender a progressão da doença e a resposta ao tratamento (CHUNG, 2015; STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015).

O TNF- α é um membro da superfamília do TNF pelo qual incluem 30 receptores e 19 ligantes com diversas funções na diferenciação celular, inflamação, imunidade e apoptose. Esta também é uma citocina produzida e liberada principalmente por macrófagos, sendo considerada um dos principais mediadores da inflamação aguda (WALLACH, 2016). Mesmo em baixas concentrações, o TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e estimula macrófagos e outras células a secretarem quimiocinas (ZELOVA; HOSEK, 2013).

O papel principal da família do TNF ocorre através da interação e da ativação de receptores do TNF (TNFR) associado a ativação de vias de sinalização como a via do NF- κ B, das MAPKs e diversas outras vias de sinalização como a das caspases, promovendo nesses casos a produção de ERO e ERN. Esta função de produção de ROS foi ignorado no passado, no entanto, agora está claro que o TNF e as ERO/ERN são parte integrante da via de sinalização dos receptores da família do TNF e estão envolvidos em numerosos ciclos de retroalimentação da inflamação (BLASER et al., 2016).

Em termos de novas opções terapêuticas já existem no mercado anticorpos monoclonais específicos para os receptores de TNF e anticorpos monoclonais anti-TNF, como o exemplo clássico temos o etarnecept utilizado em diversas doenças como a artrite reumatoide,

asma brônquica e a colite ulcerativa (BRENNER et al., 2015; MATTEI; DALMARCO; FRODE, 2015).

Outra citocina importante é o interferon gama (IFN- γ) que é secretado principalmente por células Th1 e células *natural killer* (NK) (LARKIN III et al., 2013). O IFN- γ tem como função principal a ativação de macrófagos e de neutrófilos em resposta a diferentes estímulos, como: LPS e DNA bacteriano por meio da interação com seu receptor TLR ou mesmo em reconhecimento a alguma injúria tecidual. Esta citocina tem a função primordial de estimular a expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II) nas células apresentadoras de antígenos (APC) e também moléculas co-estimulatórias como, por exemplo: os clusters de diferenciação CD80 e CD86 promovendo a estimulação do processamento e a apresentação de antígenos por APCs (SCHURGERS et al., 2011). Do mesmo modo, esta citocina é capaz de induzir a expressão de MHC-II em células que normalmente não expressariam esta molécula, o que associa o IFN- γ ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como o LES (SCHURGERS et al., 2011, LARKIN III et al., 2013).

Além de atuar sinergicamente com o TNF- α estimulando a secreção de quimiocinas (proteína induzida por IFN- γ (IP-10), proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1), quimiocina secretada expressa e regulada sob ativação de linfócitos T (RANTES)) em monócitos e linfócitos, o IFN- γ também estimula a diferenciação de células T virgem em células Th1, quando na presença de IL-12, secretado via APCs (SCHURGERS et al., 2011). Além disso, o IFN- γ tem a função de induzir a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) promovendo, no endotélio, uma melhor aderência dos leucócitos para realizarem a diapedese para o local da inflamação (SCHURGERS et al., 2011, LARKIN III et al., 2013). A este respeito, o bloqueio de IFN γ foi eficaz em reverter a progressão na doença de Crohn, associado a diminuição de neutrófilos recrutados para o sítio inflamatório (CUI et al., 2013).

Em relação a IL-12, esta é uma citocina pro-inflamatória produzida por monócitos, células dendríticas, macrófagos e células B. A família de citocinas IL-12 é responsável pela estimulação de células T a uma resposta de diferenciação a Th1 e/ou Th17 e a sua secreção tem sido associada à imunidade inata, bem como ao desenvolvimento de imunidade adaptativa caracterizada pela indução de secreção de IFN- γ , promovendo um ciclo de retroalimentação positiva e contínua (TRINCHIERI, 2003).

A sinalização através do receptor de IL-12 (IL-12R) depende essencialmente da ativação de quinases JAKs. Após a ativação do receptor de tirosina quinase ocorre a fosforilação da proteína intracelular transdutora de sinal e ativadora da transcrição 4 (STAT4), resultando na estimulação de genes alvos de transcrição como a proteína ativadora-1 (AP-1) que medeia a atividade biológica de IL-12 (VIGNALI, KUCHROO, 2012).

A ação de IL-12 em células T e células NK promove vários efeitos biológicos como a ativação de macrófagos que são estimulados a produzir IFN- γ promovendo a estimulação da produção de NO. Outra função seria a de promover a polarização de linfócitos T CD4+ virgens para um fenótipo do tipo Th1, como é observado em doenças como artrite reumatóide, esclerose múltipla e em uveítes (SUN et al., 2007; SUN et al., 2015).

Como mencionado, o papel da IL-12 tem sido associado à atividade ou a progressão de um perfil de resposta Th1, como acontece no caso da psoríase, artrite reumatóide, doenças inflamatórias intestinais, diabetes mellitus do tipo 1 e também no câncer (ZUNDLER; NEURATH, 2015).

Não menos importante a IL-6 é uma citocina característica do processo inflamatório agudo. Sua função é bastante ambígua uma vez que pode induzir a diferenciação de células B regulatórias (Breg) a secretar a interleucina 10 (IL-10) com propriedades anti-inflamatórias (RATH et al., 2015). Porém ainda a IL-6 é considerada o mediador chave na transição da inflamação de fase aguda para crônica (SCHELLER et al., 2011).

A IL-6 é uma citocina secretada por diferentes tipos de células (monócitos, macrófagos, células T, fibroblastos e células endoteliais) e é importante tanto na imunidade inata quanto adaptativa (SCHAPER; ROSE-JOHN, 2015). Este mediador apresenta diferentes funções biológicas, dentre os quais se destacam: a proliferação e a diferenciação celular, especialmente de linfócitos Th17 e monócitos em macrófagos (DITTRICH et al., 2015, SCHAPER; ROSE-JOHN, 2015). Esta citocina também estimula a produção de imunoglobulinas (Ig) do tipo IgG, IgM e IgA por células B e de citocinas como a interleucina 21 (IL-21) por células T CD4+ virgem e de memória, além de induzir a produção de proteínas de fase aguda, tais como proteína C reativa (PCR), haptoglobina e α 1-antitripsina pelos hepatócitos (RATH et al., 2015). Em particular, a sinalização de IL-6 promove a manutenção de uma resposta a nível sistêmico e local da inflamação aguda, também via

linfócitos T secretores de IL-17, em tecidos inflamados (NEURATH; FINOTTO, 2011).

Um exemplo clássico é o uso do Tocilizumab, anticorpo monoclonal anti-receptor de IL-6 (anti-IL-6R) que foi aprovado em mais de 100 países para o tratamento da artrite reumatoide e outras doenças autoimunes, comprovando o envolvimento desta citocina em doenças de caráter inflamatório e autoimune (SCHAPER; ROSE-JOHN, 2015).

1.3.4 FATORES DE TRANSCRIÇÃO

1.3.4.1 FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B (NF- κ B)

Para a ativação de células através de mecanismos intracelulares, existe um controle dependente da atividade de fatores de transcrição. Os fatores de transcrição são proteínas intracelulares que controlam a expressão gênica e medeiam a ativação, sobrevivência, diferenciação, apoptose e/ou migração celular durante o processo inflamatório. Dentre os fatores de transcrição mais bem estudados, destaca-se o NF- κ B.

O NF- κ B é um fator de transcrição nuclear essencial que regula a atividade de diversos genes a nível nuclear, dentre os quais se pode destacar os genes relacionados à produção e indução de enzimas como a NOSi e a ciclooxigenase-2 (COX-2), de interleucinas (IL-1, IL-6, IL-17), da família do TNF e de moléculas de adesão (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1) (BAEUERLE & BALTIMORE, 1996; LAWRENCE, 2009).

A família NF- κ B é composta por diferentes membros, entre eles: RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50 e seu precursor p105) e NF- κ B2 (p52 e seu precursor p100). A atividade dos diferentes dímeros do NF- κ B é regulada por sua interação com proteínas inibitórias (p105, p100), proteínas inibitórias kappa B-alpha, beta, gama (I κ B- α , β , γ), que mantém estes complexos no citoplasma da célula em sua forma inativa. Quando a célula recebe um sinal para a ativação do NF- κ B, ocorre a interação para a ativação de um complexo de alto peso molecular, que contém uma proteína cinase I κ B (IKK) que estimula o NF- κ B em duas diferentes vias de sinalização, a canônica e a não canônica (HAYDEN & GHOSH, 2008; HAYDEN; GHOSH, 2014).

A via mais estudada é a via canônica (Figura 05) que após a ativação de receptores TLRs, receptores de IL-1 (IL-1R) e TNFR ocorre a ativação do complexo I κ B cinase (IKK), com fosforilação da proteína I κ B α , a qual se acredita ser a principal proteína responsável da via

canônica responsável por regular a ativação de p65, que então migra para o núcleo para agir em genes alvos.

Do mesmo modo, outros desencadeadores, tais como o ligante de superfície de células B (cluster de diferenciação 40 - CD40L) e a linfotóxina β , também podem levar a ativação do NF- κ B pela chamada via alternativa ou via não-canônica (HOESEL; SCHMID, 2013; HAYDEN; GHOSH, 2014).

Nesta via os sinais são mediados por diferentes receptores, que incluem o fator de ativação de células B (BAFFR), CD40, o receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), entre outros. Na sequência, ocorre a ativação da cinase indutora do NF- κ B, que fosforila e ativa a IKK1. Esta ativação induz a fosforilação de p100, resultando na ubiquitinação e degradação parcial de p52 que induz a levar informação ao núcleo da célula (HOESEL; SCHMID, 2013).

1.3.4.2 PROTEÍNAS QUINASES ATIVADAS POR MITOGENOS (MAPK) p38

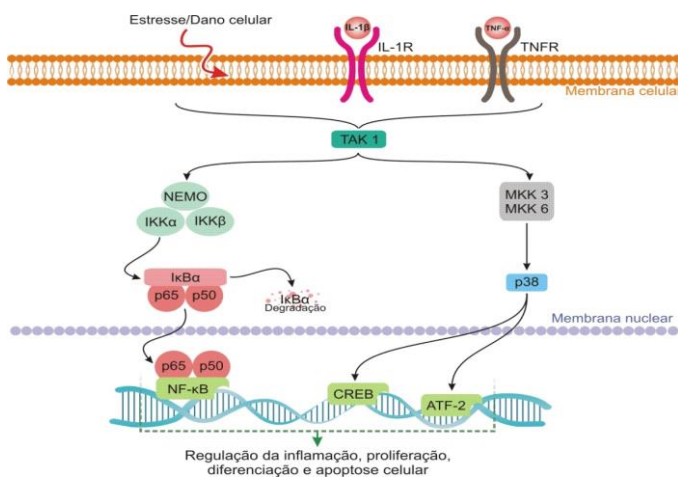
Nos organismos multicelulares existem três caracterizadas proteínas MAPKs: quinases reguladas por sinal extracelular (ERK); quinases c-Jun N-terminal (JNK) e as quinases p38. Essas MAPKs englobam um grande número de proteínas que fosforilam os aminoácidos serina/treonina e regulam os processos celulares, como: crescimento, proliferação e também a diferenciação celular (PASTUHOV et al., 2015).

A p38 é um membro da família das MAPK, envolvida em doenças, como: asma, doenças autoimunes, câncer, Alzheimer e Artrite Reumatoide. A partir de diferentes estímulos, como LPS, peptídeo glicanos de bactérias, radiação ultravioleta (UV) pode ser ativada em diferentes tipos celulares (macrófagos, monócitos, neutrófilos e células epiteliais) e também mais comumente através de citocinas (TNF- α , IL-1 β) (NICK et al., 2000).

Tipicamente, a ativação da via das MAPKs é iniciada por citocinas inflamatórias, como o TNF- α , que ao interagir com seu receptor, promove a ativação da cascata e a fosforilação proteica. As formas fosforiladas da p38 por sua vez ativam AP-1 o qual leva a informação até o núcleo onde ativa a transcrição de genes codificadores de moléculas de adesão (VCAM-1) e mediadores como o próprio TNF- α , interleucinas como: IL-1 β , IL-17, IL-3, IL-6, IL-8, prostaglandina E2 (PGE2) e também a indução da COX-2 (YANG et al., 2014) (Figura 05).

Sendo assim, a inibição da ativação dessa via pode ser um mais um alvo seletivo e importante em doenças de curso inflamatório contínuo e na auto-imunidade, principalmente aquelas que envolvem neutrófilos. Há de se ressaltar também que tal via interliga-se com a NF- κ B podendo assim ativá-lo. Sendo assim p38 é um possível alvo para o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades anti-inflamatórias (ASHWELL, 2006).

Figura 05 - Esquema de ativação da via canônica do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e proteína quinase ativada por mitógeno (p38 MAPK).



ATF-2: Proteína transcricional dependente de monofosfato de adenosina; Cg: carragenina; CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta ao monofosfato cíclico de adenosina; NEMO: proteína inibitória *kappa* B quinase; IKK α : Proteína inibitória *kappa* B quinase alpha; IKK β : Proteína inibitória *kappa* B quinase beta; I κ B α : subunidade inibitória do NF-KB; p65 e p50: subunidades (RelA e RelB de NF-KB); MKK3 e MKK6: proteína quinase dupla induzida por mitógeno; p38: proteína quinase ativada por mitógeno. **Fonte:** Marcus Vinicius P.S. Nascimento.

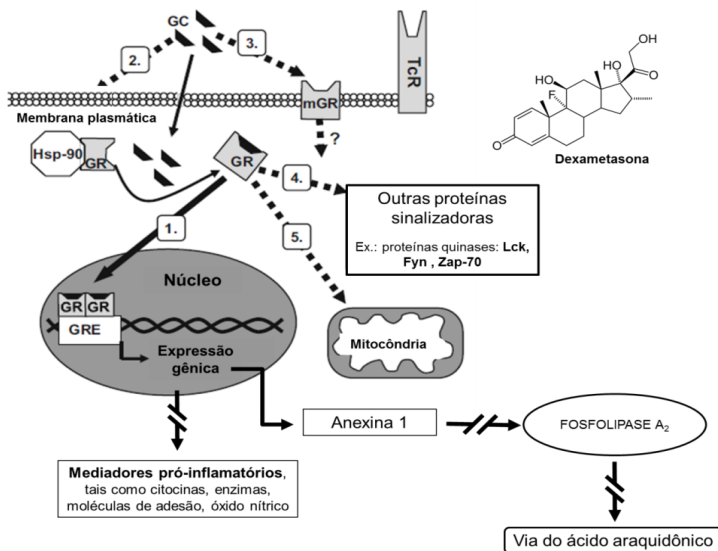
1.4 FÁRMACO ANTI-INFLAMATÓRIO

Neste estudo foi utilizado a dexametasona (Dexa) como fármaco anti-inflamatório de referência. Os glicocorticoides possuem um papel importante na regulação do metabolismo, da pressão arterial e do sistema imune e atuam através de vários eventos da resposta inflamatória (FLAMMER; ROGATSKY, 2011; QUAX et al., 2013). O mecanismo de ação desta classe de medicamentos pode ser classificado em não-genômico e genômico (BARNES, 2010; FLAMMER; ROGATSKY, 2011). Os efeitos não-genômicos podem ser divididos em 4 mecanismos: 1) sinalização por meio de um receptor de membrana citoplasmática; 2) efeito direto na membrana citoplasmática; 3) interação entre o receptor de glicocorticoide e outras proteínas sinalizadoras no citoplasma celular; e 4) translocação do receptor de glicocorticoide para a mitocôndria (BOLDIZSAR et al., 2010; VANDEVYVER et al., 2013).

Já o seu efeito genômico ocorre por meio da ligação entre o glicocorticoide e um receptor específico presente no núcleo da célula, onde o mesmo atua como um fator de transcrição, ligando-se a elementos responsivos aos glicocorticoides na região promotora de genes alvos e assim modula a expressão gênica por meio da transrepressão ou transativação (BOLDIZSAR et al., 2010).

A transrepressão gênica faz com que o complexo receptor-glicocorticoide formado interfira na transcrição de genes alvo, tais como de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, IL-13, IL-15, TNF- α), fatores de crescimento (fator estimulador de colônia de macrófago e granulócitos (GM-CSF), fator de célula tronco (SCF)), moléculas de adesão (ICAM-1), (VCAM-1), NO, entre outros (BARNES, 2010; VANDEVYVER et al., 2013). Na figura 06, está ilustrado o mecanismo de ação anti-inflamatória dos glicocorticoides.

Figura 06 - Vias de sinalização genômica e não-genômica dos glicocorticoides em células T.



1) via genômica clássica, demonstrando a transativação gênica da anexina 1, a qual inibe a enzima fosfolipase A₂, inibindo a via do ácido araquidônico, e a transrepressão gênica de mediadores pró-inflamatórios; 2) efeitos diretos na membrana; 3) sinalização por meio de um receptor de membrana (mGR); 4) interação do GR com proteínas sinalizadoras citoplasmáticas; 5) via mitocondrial. GC = glicocorticoide, GR = receptores de glicocorticoides, GRE = elementos responsivos aos glicocorticoides, TcR = receptor de células T. Seta contínua (\longrightarrow) = vias de sinalização genômica; setas tracejadas (\dashrightarrow) = vias de sinalização não-genômica; seta interrompida (\dashrightarrow) = inibição. Fonte: Adaptado de BOLDIZSAR et al., 2010. Acesso 05/03/2015.

1.5 MODELOS DE INFLAMAÇÃO

A formação de edema, infiltração de leucócitos e liberação de mediadores pró-inflamatórios são eventos que ocorrem em diversas doenças de caráter inflamatório. Para a avaliação do efeito anti-inflamatório de fármacos ou plantas, diferentes modelos já foram descritos, tais como a pleurisia, a bolsa de ar, o edema de pata, a artrite e o implante de esponjas embebidas em agentes irritantes (SEDGWICK; LEES, 1986; WEBB, 2014).

Existem modelos experimentais que mimetizam doenças que acometem humanos e permitem a avaliação das alterações morfológicas, imunológicas e fisiológicas, em animais como camundongos e ratos (BRITO, 1989; LEWKOWICH; WILLS-KARP, 2008; MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008).

Entre os modelos utilizados para a indução de inflamação pulmonar, destacam-se a indução de infecção pulmonar por bactérias (*klebsiella pneumoniae*, *pseudomonas auriginosa*), uso de LPS para a estimulação da resposta imune inata via receptores do tipo TLR4, hiperventilação mecânica, utilização de bleomicina, ácido oléico, isquemia/reperfusão, entre outros (HOFFMANN et al., 2005; MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008; SLUTSKY; RANIERI, 2013).

Dentre os modelos experimentais para a indução de inflamação pulmonar, pode-se destacar o modelo de inflamação eosinofílica, no qual camundongos BALB/c são sensibilizados com ovalbumina (OVA) e desenvolvem uma inflamação eosinofílica e hiperresponsividade nas vias aéreas, promovendo um quadro de asma leve a moderada (GIRODET et al., 2013). Da mesma forma existem modelos experimentais em camundongos que mimetizam outro tipo de asma, a do tipo neutrofílica. Nesta condição, a resposta inflamatória pulmonar apresenta predomínio do influxo de neutrófilos para o pulmão, sendo considerado um quadro de asma grave (STEIN et al., 2014).

Dentre estes modelos de inflamação neutrofílica, destaca-se o modelo da pleurisia induzida pela Cg, em camundongos. A Cg é uma mistura de polissacarídeos extraída das algas *Eucheuma denticulatum*, *Kappaphycus alvarezii*, *Chondrus crispus* e *Gigartina radula* (PRAJAPATI et al., 2014) tratando-se de uma substância irritante muito utilizada para a indução de inflamação em estudos experimentais (PRAJAPATI et al., 2014; MCKIM et al., 2015).

O modelo de inflamação induzida pela carragenina em camundongos é um modelo muito bem caracterizado que permite a quantificação de diferentes mediadores pró-inflamatórios liberados na cavidade pleural. Nesse modelo observa-se uma resposta inflamatória do tipo bifásica, sendo que na primeira fase (4 h) desta resposta ocorre a formação de proteínas do exsudato, aumento da infiltração de leucócitos, principalmente neutrófilos, seguido de lesão pulmonar por ERO e ERN liberados por tais neutrófilos ativados no sítio inflamatório. Os radicais como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânion superóxido (O₂⁻), radical hidroxila (OH⁻) e peroxinitrito (ONOO⁻) são os principais mediadores liberados em grande quantidade na cavidade pleural dos

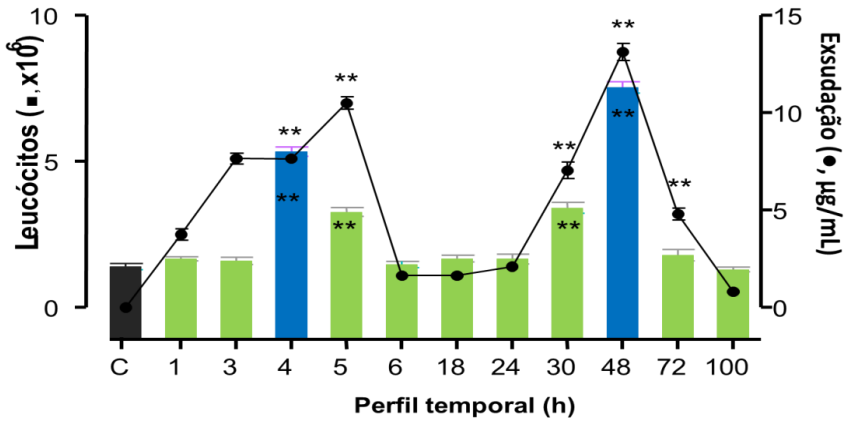
camundongos. Na segunda fase (48 h), observa-se também aumento das proteínas da exsudação, bem como uma inversão da celularidade e o aumento do recrutamento de leucócitos do tipo mononucleares (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1996).

Em circunstâncias patológicas, tais observadas em pacientes com fenótipo de asma neutrofílica, o excesso de produção de ERO e ERN e a liberação de mediadores inflamatórios com formação de edema, promove alterações no epitélio, a ativação de células endoteliais que permitem a amplificação da resposta inflamatória no tecido pulmonar e consequente sua disfunção (MARTINEZ; VERCELLI, 2013).

A escolha do modelo a ser utilizado, o tipo de animal (cobaias, camundongos, ratos, macacos) a linhagem (swiss, BALB/c, C5BL/6) permite de forma fidedigna avaliar alterações morfológicas, imunológicas e fisiológicas que acontecem nas vias aéreas em doenças de caráter inflamatório onde existe um predomínio do recrutamento de neutrófilos, como é o caso na asma neutrofilia e na injúria pulmonar aguda (BLUME; DAVIES, 2013; BHARGAVA; WENDT, 2015).

Devido a este modelo ser considerado eficaz para a avaliação do efeito anti-inflamatório de extratos de plantas e por ser considerado um bom modelo de inflamação das vias aéreas, o presente trabalho optou pelo modelo experimental da pleurisia induzida por Cg em camundongos utilizando-se apenas da primeira fase (4 h) da resposta inflamatória. Assim o modelo utilizado no trabalho visa à administração intrapleurial (i.p) de carragenina que permite a quantificação e a correlação das proteínas do exsudato e a migração celular, com mudanças nos parâmetros inflamatórios e uma possível correlação na patogênese de tais doenças inflamatórias das vias aéreas que envolvem neutrófilos: como na lesão pulmonar aguda (LPA), síndrome do desconforto respiratório agudo (SARA) e a asma neutrofílica (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; WEBB, 2014). Sendo assim, a pleurisia pode ser considerada um bom modelo para a avaliação de plantas/fármacos com potencial atividade anti-inflamatória (Figura 07).

Figura 07 - Perfil temporal do modelo da pleurisia induzida pela carragenina (Cg) em camundongos.



O modelo de inflamação induzido pela Cg é caracterizado por uma resposta inflamatória do tipo bifásica. Na primeira fase (4 h) ocorre o aumento da infiltração de leucócitos, principalmente neutrófilos, bem como a exsudação na cavidade pleural. Já na segunda fase (48 h), observa-se, também, o aumento da exsudação, além do aumento de células mononucleares. Fonte: Adaptado de SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996.

1.6 HIPÓTESE

H1: O extrato bruto (EB) não apresenta efeito tóxico. O material vegetal (EB), fração aquosa (Aq), fração butanol (BuOH), fração acetato de etila (AcEOt), fração hexano (Hex), fração diclorometano (DCM) e o compostos isolados curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR) e piptizol (Pip) provenientes das raízes de *Jungia sellowii* Less inibem a resposta inflamatória causada pela carragenina caracterizada pela diminuição das concentrações de: leucócitos, proteínas do exsudato, mieloperoxidase, adenosina desaminase, óxido nítrico, TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-12 e de NF- κ B e p38MAPK;

H0: O extrato bruto (EB) apresenta efeito tóxico. O material vegetal (EB), fração aquosa (Aq), fração butanol (BuOH), fração acetato de etila (AcEOt), fração hexano (Hex), fração diclorometano (DCM) e o compostos isolados curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR) e piptizol (Pip) provenientes das raízes de *Jungia sellowii* Less não inibem a resposta inflamatória causada pela carragenina caracterizada pelo aumento das concentrações de: leucócitos, proteínas do exsudato, mieloperoxidase, adenosina desaminase, óxido nítrico, TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-12 e a ativação de NF- κ B e p38MAPK.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil tóxico do extrato bruto e o efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados obtidos das raízes de *Jungia sellowii* Less, administrados por via intraperitoneal (i.p) no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Avaliar o potencial de toxicidade do extrato bruto (EB) de *Jungia sellowii* Less utilizando testes *in vitro* e *in vivo* de toxicidade aguda;

II. Avaliar o efeito do EB, frações e compostos isolados de *J. sellowii* L. sobre a migração dos leucócitos e a concentração das proteínas do exsudato, no lavado da cavidade pleural de camundongos;

III. Avaliar o efeito do EB, frações e compostos isolados de *J. sellowii* L. sobre as concentrações das enzimas MPO e ADA, além dos metabólitos do NO_x, no lavado da cavidade pleural de camundongos;

IV. Avaliar o efeito do EB, frações e compostos isolados de *J. sellowii* L. sobre a resposta imune Th1 dosando as concentrações de interleucinas pró-inflamatórias: TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL 12, no lavado da cavidade pleural de camundongos;

V. Avaliar o mecanismo de ação anti-inflamatória dos compostos isolados, pela análise da via de sinalização do NF- κ B, no tecido pulmonar de camundongos;

VI. Avaliar o mecanismo de ação anti-inflamatória dos compostos isolados, pela análise da ativação da cascata de sinalização intracelular p38 MAPK, no tecido pulmonar de camundongos.

3. METODOLOGIA

3.1 MATERIAL VEGETAL

3.1.1 Obtenção do material vegetal

As raízes de *Jungia sellowii* Less foram coletadas na fazenda São Pedro em Rio Negrinho no Estado de Santa Catarina (SC), em março de 2012. A identificação botânica foi realizada pelo Dr. Ademir Reis, do Departamento de botânica da UFSC e uma exsiccata foi tombada no Herbário Dimitri Sucre Benjamindo - Jardim Botânico no Rio de Janeiro (JBRJ) sob o número RB 537991.

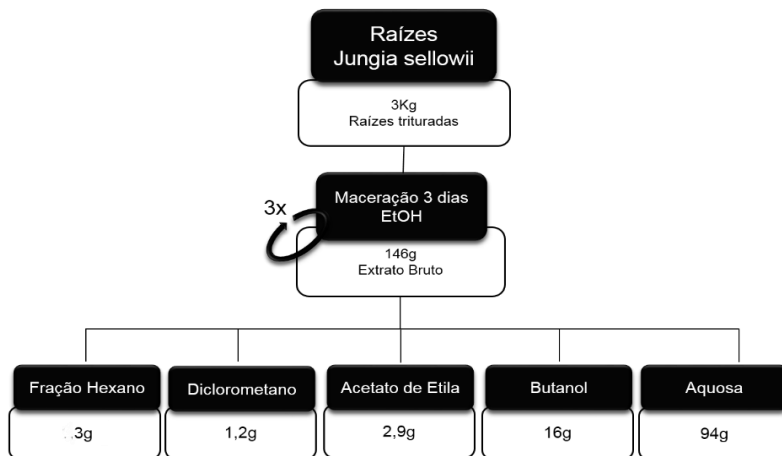
3.1.2 Preparo dos extratos e particionamento

As raízes (3 kg) trituradas de *J. sellowii* L. foram maceradas com etanol 70°Gl por 3 dias na ausência de luz e macerado novamente mais duas vezes, sob as mesmas condições experimentais obtendo-se o extrato bruto etanólico (EB).

Ao extrato bruto foi adicionado água (1/3) e o mesmo foi submetido à partição líquido-líquido, com os seguintes solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. As frações foram coletadas separadamente e concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, pesadas e armazenadas em recipientes hermeticamente fechados, protegidos da luz. Os resultados da obtenção das respectivas frações, observadas na Figura 08, foram: Hexano (3 g); Diclorometano (1,2 g), Acetato de etila (2,9 g), Butanol (16 g) e Aquosa (94 g).

Todas as análises fitoquímicas foram realizadas pelas alunas de Mestrado: Luíse Azevedo Lima e Daniela W. Rosa em parceria com a Prof^a. Dr^a. Maique Weber Biavatti do Laboratório de Química de Farmacêutica (Departamento de Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde (CCS) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)).

Figura 08 - Diagrama da sequência de obtenção do extrato bruto e frações das raízes de *Jungia sellowii* Less.



Fonte: Luíse de Azevedo Lima.

3.1.3 Análise do perfil das frações acetato de etila e butanol por UPLC

A análise foi realizada utilizando um sistema de ultracromatografia de alta eficiência Acquity H-Class UPLC (Waters Co.) equipado com detector de arranjo de diodos (PDA). A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se uma coluna de separação Acquity UPLC BEH C18 (mm2 50 x 2.1, 1,7 μ M), a uma taxa de fluxo de 250 mL/min com um volume de injeção de 2 mL. A fase móvel consistiu de um sistema de gradiente de 0,1% da combinação de ácido fórmico aquoso (pH 3,0) (A) e acetonitrilo (B). Para a fração acetato de etila a injeção dos solventes foi no tempo de 0-5 min com 65% de ácido fórmico aquoso (A), no tempo de 5-6 min com acetonitrilo a 98% (B) e em 6-7 min a 65% de ácido fórmico aquoso (A). Para a fração butanol a injeção dos solventes foi no tempo de 0-5 min a 80% de ácido fórmico aquoso (A), 5-6 min a 90% de acetonitrilo (B), 6-6,1 min a 98% de acetonitrilo (B) e 6,1-7 min a 80% de ácido fórmico aquoso (A).

3.1.4 Elucidação Estrutural

As substâncias isoladas foram submetidas a análises espectrométricas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C em diferentes laboratórios de pesquisa localizados em diferentes Departamentos: 1) Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em equipamento Varian modelo AS400 (Fonte: Middelburg, Holland), 400 MHz para Hidrogênio e 100 MHz para Carbono; 2) No departamento de química, Universidade Federal do Paraná (UFPR) no laboratório de ressonância magnética nuclear em equipamento BRUKER, modelo DRX 400, série AVANCE, (Fonte: Bruker Daltonik, Bremen, Germany) com frequência do ^1H em 400 MHz e do ^{13}C em 100,62 MHz e 3) No Departamento de Farmacognosia, Universidade René Descartes – França em equipamento Bruker AC-300 e Bruker Avance-400 (Fonte: Bruker Daltonik, Bremen, Germany) em 400 MHz para ^1H e a 75 MHz para ^{13}C .

3.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

3.2.1 Teste de citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de 3-(4,5-dimethylazol-Zyl) 2-5-brometo de difeniltetrazólio (MTT) em suspensão de macrófagos J774, a uma concentração de $1,0 \times 10^4$ células/mL, como descrito por MOSMANN, 1983. Uma placa com 200 μl de células foi incubada a 37°C em incubadora com CO_2 durante 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com respectiva solução salina utilizada como controle (NaCl, 0,9%) ou EB de *J. sellowii* L., nas concentrações de 1 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml e 0,001 mg/ml. Ao final de 24 h do experimento, o sobrenadante foi removido, e foi adicionado meio fresco contendo 10% (v/v) de solução de MTT (5 mg/ml) em PBS (pH 7,6, composição: NaCl, 130 mmol; Na_2HPO_4 , 5 mmol; e KH_2PO_4 , 1 mmol). A placa foi incubada durante 2 h a 37°C e o sobrenadante foi removido posteriormente. Em seguida, 100 μl de uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) puro foram adicionados a cada poço e a placa foi agitada em agitador automático durante 10 min. O sobrenadante posteriormente foi lido a 540 nm em leitor de placas de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (EIE) (Organon Teknika, Roseland, NJ, EUA). A densidade óptica do grupo de controle foi considerada como 100% de células viáveis.

3.3 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

3.3.1 Delineamento do estudo

Estudo experimental, prospectivo e controlado.

3.3.2 Animais

Camundongos albinos *Swiss* fêmeas (n = 600), pesando entre 18 e 22 g e com um mês de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC, foram utilizados em todos os experimentos *in vivo*. Estes animais foram divididos aleatoriamente em 12 grupos de cinco animais: grupo 1 (controle negativo) animais que receberam apenas uma injeção intrapleural, de solução salina estéril (NaCl, 0,9%, i.pl.), grupo 2 (controle positivo) animais que receberam apenas carragenina (Cg 1%, i.pl.), grupo 3 animais que receberam uma injeção intraperitoneal de Dexametasona (Dexa): 0,5 mg/kg, (i.p) + Cg, grupos de 4 a 11 animais que receberam uma injeção (i.p) de diferentes doses de EB, frações ou compostos isolados de *Jungia sellowii* Less + Cg. Os animais mencionados receberam alimentação e água *ad libitum* durante todos os dias, inclusive nos dias de experimentação. Estes animais também foram acomodados em gaiolas plásticas com serragem, sob temperatura ambiente controlada (21 ± 2 °C), ciclos claro/escuro alternando a cada 12 h e umidade entre 50-60%. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA – protocolo número PP00757/CEUA/2011) e os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.3.3 Procedimento anestésico

Neste protocolo experimental, a anestesia foi induzida com 75 mg/kg de cetamina e 15 mg/kg de xilazina. Para tal preparou-se uma mistura de duas partes iguais de cetamina a 10% e xilazina a 2% (1:2). Em animais pesando 20 ± 2 g administrou-se 30 μ L da solução por via intraperitoneal (i.p.). Após cerca de 2 a 5 minutos da anestesia ou quando os animais já não apresentavam reflexos responsivos iniciavam-se os experimentos.

3.3.4 Eutanásia dos animais

Para o procedimento de morte indolor assistida foi utilizado um protocolo aprovado pela CEUA onde os animais foram previamente anestesiados com 0,03 mL (30 μ L ou 3 unidades) de cetamina (75 mg/kg) + xilazina (15 mg/kg) i.p. a fim de evitar qualquer desconforto no procedimento. Antes de administrar a solução saturada de cloreto de potássio (KCl) testou-se os reflexos dos animais para assegurar completa anestesia – caso necessário administrou-se mais 0,01 mL i.p do anestésico para a manutenção da dose. Para o procedimento foi utilizado uma dose letal de KCl a 75-150 mg/Kg. Para tal preparou-se uma mistura de 1 parte de KCl 10% para 3 partes de água destilada (1:4) – para animais pesando 20 ± 2 g a dose resultante foi de 125 mg/kg. Em animais pesando 20 ± 2 g administrou-se 0,1 mL da solução preparada de KCl por via intravenosa. O tempo para eutanásia variou de 1 a 2 minutos após administração do KCl.

3.3.5 Toxicidade aguda

Neste protocolo quatro grupos de 5 camundongos receberam uma única injeção de solução salina estéril (NaCl, 0,9% i.p) (veículo) ou diferentes doses de EB de *J. sellowii* L., (500, 1000 ou 2000 mg/kg) (i.p) no primeiro dia de ensaio (dia 0). Após a administração o comportamento geral dos animais foi observado de 0,25 a 3 h após a injeção e durante 14 dias. Os parâmetros de observação direta incluíram: perda de peso, tremores, convulsões, diarreia, coma e mortalidade. No décimo quarto dia, os animais foram sacrificados e os órgãos vitais: rim, baço, fígado, pulmões foram isolados e pesados (% peso úmido). Dados hematológicos: glóbulos brancos (WBC), linfócitos e mononucleares, granulócitos, eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hb), hematócrito (HT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), distribuição de glóbulos vermelhos (RDW) e contagem de plaquetas também foram realizadas ao final do experimento em contador automático veterinário (MINDRAY, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China) (WILCHES et al., 2015).

3.3.6 Pleurisia induzida pela carragenina (Cg) em camundongos

A técnica da pleurisia foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Saleh, Calixto e Medeiros (1996). A pleurisia foi induzida por uma única injeção intrapleural de 0,1 mL de Cg a 1% (diluída em solução fisiológica estéril, 0,9% de NaCl) administrados na cavidade pleural através do espaço intercostal utilizando-se uma agulha 13 x 5 mm, adaptada a uma cânula de poliestireno. Após 4 h, os animais foram submetidos à morte indolor assistida com solução de KCl saturada (125 mg/kg) administrada por via i.v, após indução da anestesia com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg). A seguir, a cavidade torácica foi exposta e lavada duas vezes com 0,5 mL (totalizando 1,0 mL) de solução salina tamponada (PBS, pH 7,6, composição: NaCl [130 mmol]; Na₂HPO₄ [5 mmol]; KH₂PO₄ [1 mmol], e água destilada [1000 mL] contendo heparina [20 IU / mL]). O lavado da cavidade pleural foi coletado para posterior quantificação dos parâmetros inflamatórios: contagem total e diferencial de leucócitos, concentrações das proteínas do exsudato, concentrações das enzimas MPO e ADA e dos metabólitos do NO_x, além das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-12). As amostras de tecido pulmonar foram coletadas para a análise das proteínas: p65 fosforilada (p-p65 de NF- κ B) e p38 MAPK fosforilada.

Para a avaliação indireta da exsudação, os animais foram tratados com solução do corante azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL/animal), administrada pela veia gengival 10 min antes da indução da pleurisia (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; OLIVEIRA; SOUZA-SILVA; TONUSSI, 2009). Para a análise das enzimas MPO e ADA, bem como da concentração de NO_x e das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-12 e na avaliação da fosforilação de p-p65 de NF- κ B e p38 MAPK, os animais não receberam a injeção com azul de Evans, uma vez que este corante poderia interferir nas dosagens colorimétricas e imunoenzimáticas empregadas para a quantificação dos parâmetros inflamatórios.

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

De acordo com o protocolo experimental, para o estudo da curva dose-resposta, diferentes grupos de animais (n = 5, por grupo) foram tratados com diferentes doses de EB (25-200 mg/kg), Hex (10-50 mg/kg), DCM (10-50 mg/kg) , AcOEt (5-25 mg/kg), BuOH (5-25 mg/kg), Aq (10-50 mg/kg), CuR (1,0-5,0 mg/kg) ou Pip (0,5-5,0 mg/kg)

administrados por via intraperitoneal, 0,5 h antes da indução da pleurisia com Cg (1%), administrada por via i.pl. A quantificação de leucócitos total e diferencial e as concentrações de proteínas do exsudato foram analisadas após 4 h.

Em relação aos solventes utilizados, o EB, frações e compostos isolados foram solubilizados em uma solução salina (NaCl a 0,9%) e quando necessário (frações apolares) adicionou-se até 10% de DMSO para uma melhor solubilização.

Em outros experimentos, para avaliar o perfil temporal, diferentes grupos de animais receberam uma dose única de EB (50 mg/kg), ou seja a melhor dose encontrada na curva dose-resposta (menor dose capaz de inibir o influxo de leucócitos e/ou proteínas do exsudato) em diferentes períodos de tempo (0,5-2 h) antes da administração da Cg e os mesmos parâmetros inflamatórios foram avaliados 4 h após a indução da pleurisia. O melhor tempo de tratamento prévio escolhido foi o menor tempo pelo qual foi observado inibição dos leucócitos e/ou das proteínas do exsudato. Os resultados obtidos para o EB foram estendidos para as frações e para os compostos isolados.

Com base nos resultados nas curvas dose e tempo resposta foram selecionadas as seguintes doses: EB: 50 mg/kg, AcOEt: 10 mg/kg, BuOH: 10 mg/kg, Aq: 25 mg/kg, CuR: 5 mg/kg e Pip: 1 mg/kg, administrados 0,5 h antes da injeção da Cg para avaliar o seu efeito sobre outros parâmetros inflamatórios: concentrações de MPO e ADA, NO_x, TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-12 proteína p65 fosforilada do NF- κ B e proteína fosforilada p38 da MAPK. Todos os parâmetros foram analisados após 4 h da indução da pleurisia.

Dexa (0,5 mg/kg) foi utilizada como fármaco de referência administrados por via (i.p), 0,5 h antes da indução da pleurisia.

3.5 TÉCNICAS UTILIZADAS

3.5.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos

Após a morte dos animais (4 h após a indução da inflamação), alíquotas de 15 μ L do lavado da cavidade pleural foram coletadas para determinar a contagem total dos leucócitos, utilizando-se contador celular automatizado veterinário ajustado os parâmetros para camundongos (MINDRAY, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China). Os resultados foram expressos em número total de leucócitos $\times 10^6$ /mL.

Para a contagem diferencial dos leucócitos, 50 μL das alíquotas do lavado da cavidade pleural foram centrifugados em citocentrífuga (Cytopro[®] cytocentrifuge Wescor, modelo: 7620 EUA) e os mesmos foram corados pelo método de MayGrünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1.000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células $\times 10^6/\text{mL}$ (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

3.5.2 Determinação dos parâmetros hematológicos

Após 14 dias da avaliação toxicológica foi realizada a morte indolor assistida dos animais e alíquotas de 15 μL do sangue total foram coletadas a fim de determinar os dados hematológicos: WBC, linfócitos, mononucleares, granulócitos, RBC, Hb, HT, VCM, HCM, CHCM, RDW e contagem de plaquetas.

Para a análise hematológica utilizou-se o contador celular automatizado veterinário ajustado os parâmetros para camundongos (MINDRAY, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China). Os resultados foram expressos de acordo com cada parâmetro específico de análise em relação a camundongos.

3.5.3 Determinação das proteínas da exsudação

A exsudação foi determinada pela avaliação indireta da concentração do corante azul de Evans, no lavado da cavidade pleural (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Assim, em cada grupo experimental, os animais foram tratados 0,5 h antes da carragenina com uma solução do corante azul de Evans (25 mg/kg), administrados por via intravenosa (i.v.), a fim de quantificar a exsudação na cavidade pleural.

No dia dos experimentos, uma alíquota (200 μL) do lavado da cavidade pleural foi coletada e mensurada por meio da densidade ótica em leitora de microplacas de enzimaensaio (EIE) (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA), em

620 nm, de acordo com a metodologia descrita por Saleh, Calixto e Medeiros (1996). Para a quantificação da concentração de azul de Evans, curvas padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,01-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tiveram suas densidades óticas determinadas. A partir destas absorbâncias, formulou-se a equação da reta que permitiu

a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em $\mu\text{g/mL}$.

3.5.4 Determinação das concentrações de mieloperoxidase (MPO)

As amostras do lavado da cavidade pleural foram coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais, para a quantificação das concentrações da enzima mieloperoxidase (MPO), de acordo com a metodologia descrita por Rao et al, 1993. Alíquotas de 20 μL do lavado da cavidade pleural ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos (0,7-140 mU/mL)) foram transferidos para placas de EIE e a reação enzimática foi iniciada com a adição de 180 μL de solução (0,167 mg/mL de orto-dianisidina, 2HCl e 0,0005% de H_2O_2). Após 15 minutos de incubação, a temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30 μL de azida sódica (1%) (RAO et al., 1993). Na etapa seguinte, as placas contendo as amostras foram lidas em leitor de EIE (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA), em 450 nm. Curvas-padrão com concentrações conhecidas da MPO (0,7-140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos em mU/mL , com o auxílio da equação da reta.

3.5.5 Determinação das concentrações de adenosina-desaminase (ADA)

As amostras do lavado da cavidade pleural (20 μL), contendo a enzima ADA, foram transferidas para cubetas iniciando-se a reação enzimática com a adição da solução de tampão fosfato [pH 6,5, 250 μL , composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e adenosina (0,5 mM)]. Após o período de incubação de 1 h a 37 °C, a reação foi bloqueada pela adição da solução (500 μL) de fenol (1 mM), nitroprussiato de sódio (0,17 mM) e tampão alcalino (500 μL : NaOCl: 11 mM e NaOH: 125 mM) (GIUSTI; GALANTI, 1984).

Além disso, foi utilizada uma solução padrão de sulfato de amônio com concentração conhecida, e de composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (15 mM). A avaliação da atividade da ADA foi quantificada pela geração de amônia liberada pela quebra da adenosina que foi adicionada ao meio. A amônia gerada reage com o fenol e o hipoclorito, reação dependente de pH alcalino e catalisada pelo nitroprussiato de sódio, favorecendo a formação de um indofenol de coloração azul. A concentração de amônia é proporcional à

concentração de indofenol produzido. As absorbâncias das amostras e dos padrões foram mensuradas em leitora de EIE (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA) em 620 nm (GIUSTI; GALANTI, 1984). Os valores da concentração de adenosina-desaminase (ADA) foram expressos em U/L.

3.5.6 Quantificação das concentrações dos metabólitos do óxido nítrico (NO_x)

O óxido nítrico (NO) foi indiretamente quantificado, no lavado da cavidade pleural, pela formação de seus metabólitos nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), utilizando a reação de Griess (GREEN et al., 1982). Para esta análise, no dia dos experimentos, 300 µL de cada amostra do lavado da cavidade pleural foi submetida à desproteinização. Em cada amostra, foram adicionados 30 µL de solução de sulfato de zinco (20%), sob agitação, em vórtex e incubadas em banho de gelo por 60 minutos. As amostras foram centrifugadas (2.500 rpm por 15 minutos) obtendo-se, desta forma, um sobrenadante límpido. Em seguida, 100 µL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para um poço de microplaca de EIE e diluídos em solução contendo 100 µL de solução saturada de cloreto de vanádio (0,8%) (p/v) e ácido clorídrico (HCl) (3%) (p/v) e, 100 µL de solução de Griess (sulfanilamida (1%) (p/v), ácido fosfórico (5%) (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v)). A mistura foi incubada por 40 minutos, a 37 °C. Nesta reação, o cloreto de vanádio converte o NO₃⁻ em NO₂⁻ e com a adição do reagente de Griess se produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades óticas em leitor de EIE (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA) em 540 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO₂⁻ (0-150 µM) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo-se a quantificação dos valores de nitrito/nitrato no exsudato da cavidade pleural, em µM, com auxílio da equação da reta.

3.5.7 Determinação das concentrações de citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-12

Para a determinação das concentrações de TNFα, IFN-γ, IL-6 e IL-12, imediatamente após a eutanásia dos animais, alíquotas do lavado da cavidade pleural foram coletadas e processada para a quantificação das citocinas. Neste protocolo, as concentrações das citocinas foram

mensuradas utilizando-se kit comercial para citometria de fluxo CBA (CBA- *cytometric beads array*) Mouse Inflammation (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As dosagens foram realizadas em citômetro de fluxo FACSVerse (BD FACSVerse™, San Jose, CA, USA) e os dados foram analisados no software FCAP Array versão 3.0., fornecido pelo mesmo fabricante. Os valores foram expressos em pg/mL. Para o kit utilizado, os limites de detecção e os coeficientes de variação estão descritos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Limites de detecção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-12 por citometria de fluxo CBA.

Citocina	Limite de Detecção (pg/mL)
TNF- α	7,3
IFN- γ	2,5
IL-12	10,7
IL-6	5,0

Tabela 2 - Coeficientes de variação (CV) intraensaios e interensaios das citocinas TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-12 por citometria de fluxo CBA.

Citocina	% CV intraensaio	% CV interensaio
TNF- α	3-4%	6-11%
IFN- γ	3-5%	5-8%
IL-12	4-15%	3-9%
IL-6	4-5%	8-11%

3.5.8 Avaliação da fosforilação de p65 (p-p65 NF- κ B)

Para a avaliação da fosforilação da proteína p65 (NF- κ B), amostras do tecido pulmonar foram coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais. A concentração total de proteínas das amostras foi ajustada para 60 μ g, utilizando-se a metodologia descrita por Lowry et al., 1951. Neste protocolo foram utilizados kits comerciais com anticorpos monoclonais específicos para a proteína p65

fosforilada para camundongos (Instant One Phospho-NF-kB p65 (Ser536) EIE - eBioscience®, San Diego, CA, USA), seguindo as orientações do fabricante. A partir das absorbâncias obtidas, foi realizada uma análise relativa comparando-se os resultados com o grupo controle negativo (salina), que representa as concentrações basais de p65 fosforilada.

3.5.9 Avaliação da proteína p38 fosforilada (p38 MAPK)

Para a avaliação da proteína p38 (p38 MAPK), amostras do tecido pulmonar foram coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais. A concentração total de proteínas das amostras foi ajustada para 60 µg, utilizando-se a metodologia descrita por Lowry et al., 1951. Neste protocolo experimental foram utilizados kits comerciais com anticorpos monoclonais específicos para p38 fosforilada para camundongos (Instant One® Phospho-p38 MAPK (Tyr180/Tyr182) EIE - eBioscience®, San Diego, CA, USA), seguindo as orientações do fabricante. A partir das absorbâncias obtidas, foi realizada uma análise relativa comparando-se os resultados com o grupo controle negativo (salina), que representa as concentrações basais de p38 fosforilada.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilks. As variáveis de distribuição normal foram sumarizadas como média e desvio padrão da média, sendo que as variáveis categóricas foram apresentadas em percentual. Para a análise estatística dos resultados (animais tratados com agente flogístico x animais tratados com a *Jungia selowii* Less) foi utilizado o teste paramétrico de variância (ANOVA) bicaudal, seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Para todas as análises valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados foram analisados pelo Programa estatístico Graph Pad versão 5.0, CA, USA.

3.6 FÁRMACOS E REAGENTES

Neste estudo, foram utilizados os seguintes reagentes e fármacos: dexametasona (Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil), xilasina e cetamina (Hypnol®, Cristália, São Paulo, SP, Brasil), carragenina-λ (grau IV), hidróxido de sódio (NaOH), mieloperoxidase de neutrófilos humanos, o-dianisidina.2HCl

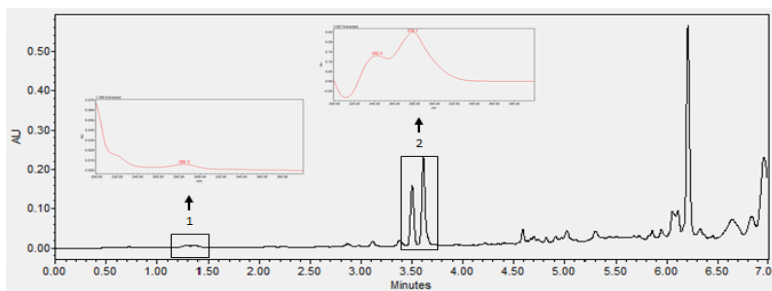
(3,3'-dimetoxibenzidina), azida sódica, cloreto de vanádio (III) (VCl_3), sulfanilamida ($C_6H_8N_2O_2S$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30 %) (Biotech, São Paulo, SP, Brasil), adenosina ($C_{10}H_{13}N_5O_4$) (Fluka, Ronkonkoma, Nova York, EUA), heparina (Liquemine[®], Roche, São Paulo, SP, Brasil), fosfato de sódio (NaH_2PO_4), sulfato de zinco ($ZnSO_4$) (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), fenol (C_6H_5OH), fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), nitroprussiato ($C_5FeN_5Na_2O \cdot 2H_2O$) (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil), sulfato de amônio (NH_4SO_4) (Labsynth, São Paulo, SP, Brasil), ácido clorídrico (HCl), etanol PA, acetato de etila PA, hexano PA (Synth, Diadema, SP, Brasil), May-Grünwald (Newprov, Pinhais, PR, Brasil), Giemsa (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), Azul de Evans ($C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$) (Acros-Organics, Geel, Antwerp, Bélgica); Dihidrocloro de N-(1-naftil)-etilenodiamina ($C_{12}H_{16}Cl_2N_2$) (Merck, Frankfurter, Darmstadt, Alemanha). Neste protocolo foram utilizados ainda, kits de citometria para a quantificação de IL-12, TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN-gama. Também foi utilizado: Insta One Phospho-NF- κ B p 65 (Ser536) para camundongos das empresas IBL Immuno Biological Laboratories Co., Ltd. (Fujioka-city, Gunma, Japan), BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA) e Insta One Phospho-p38 e total eBioscience, Inc. (San Diego, CA, USA.), respectivamente. Outros sais e reagentes de grau de pureza analítica foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

4. RESULTADOS

4.1 Cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC-PDA) de *J. sellowii* L., frações acetato de etila e butanol.

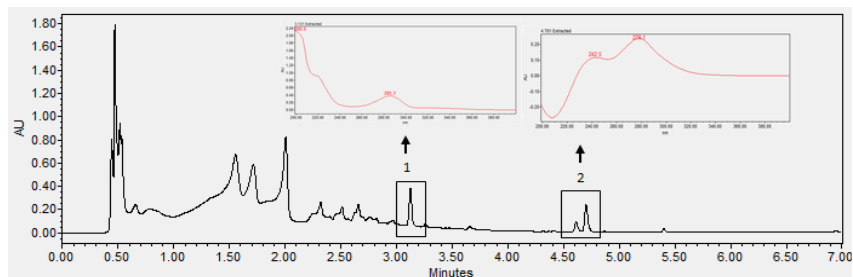
O método UPLC foi empregado a 280 nm e 285 nm respectivamente, para a identificação dos compostos na fração butanol e acetato de etila. A fração acetato de etila mostrou no primeiro pico a CuR com tempo de retenção de 1,38 min e o segundo pico o Pip com 3,50 - 3,61 de retenção de tempo. O cromatograma da fração butanol mostrou no pico 1 o composto CuR com tempo de retenção de 3,13 min e o segundo pico o Pip com tempo de retenção de 4,52 - 4,62 min (Figura 9 e 10). Após analisado o perfil cromatográfico, foram reunidos os conteúdos com características semelhantes. As amostras foram submetidas à análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), visando a identificação dos compostos por comparação com o tempo de retenção de padrões já conhecidos (Figuras 11 e 12).

Figura 09 - UPLC da fração de acetato de etila de *J. sellowii* L. em 285 nm. Numero 1: curcuhydroquinona *O*- β -glicose e número 2: α e β piptizol.



Fonte: Daniela Weingärtner Rosa.

Figura 10 - UPLC da fração butanol de *J. sellowii* L. a 280 nm. Número 1: curcuhidroquinona *O*- β -glicose e número 2: α e β piptizol.

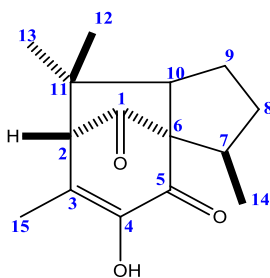


Fonte: Daniela Weingärtner Rosa.

4.2 Determinação estrutural dos constituintes de *Jungia sellowii* Less

Considerando os dados fornecidos pela correlação de ligações múltiplas heteronucleares (HMBC) para a identificação dos compostos, sendo estas as correlações que os hidrogênios apresentaram em correlação com os carbonos, propôs-se para o composto isolado desconhecido retirado da fração acetato de etila a estrutura do α e β piptizol (Figura 11) (1) (PM 248 g/mol), com a denominação química de (3R,3aR)-5-hidroxi-3,6,8,8-tetrametil-2,3,8,8a-tetrahydro-1H-3a,7-metanoazuleno-4,9(7H)-diona.

Figura 11 – Estrutura química proposta para o composto 1 (PM 248 g/mol).

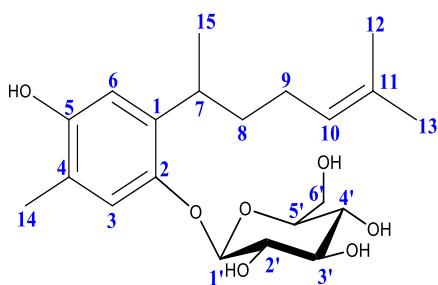


(1) Piptizol

Fonte: Luíse de Azevedo Lima.

Já para o composto isolado em maior quantidade da fração butanol foi determinado a estrutura da curcuhidroquinona *O*- β -glicose (Figura 12) (2) (PM 396 g/mol), com a denominação química de 2-(4-hidroxi-5-metil-2-(6-metilhept-5-en-2-il)fenoxi)-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triol a partir de análises de RMN ^1H (400 MHz, acetona d_6) e RMN ^{13}C DEPT 135 (100 MHz, acetona d_6) e análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – RMN 2D HSQC.

Figura 12 – Estrutura química proposta para o composto 2 (PM 396 g/mol).



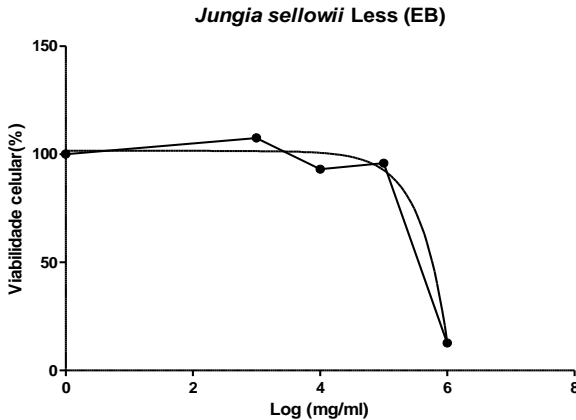
(2) Curcuhidroquinona *O*- β -glicose

Fonte: Luíse de Azevedo Lima.

4.3 Teste de citotoxicidade

Inicialmente, foi realizada uma avaliação dose-resposta dos possíveis efeitos citotóxicos de *J. sellowii* L. sobre macrófagos linhagem J774. As células foram expostas à diferentes concentrações de EB (1, 0,1, 0,01 e 0,001 mg/mL) durante 24 h. Os resultados do ensaio de MTT foram comparados com células tratadas com o veículo salina, definido como 100% e células viáveis. Os resultados para as células expostas ao EB de *J. sellowii* L. foram apresentados como sendo o aumento ou a diminuição relativa da viabilidade celular. Com base nos resultados foi calculada a concentração citotóxica (CC) pelo qual foi estipulada a dose capaz de promover a morte de 50% das células (macrófagos). Para o EB de *J. sellowii* L. a concentração determinada foi de 580 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 13).

Figura 13 – Curva de citotoxicidade celular do extrato bruto (EB) de *J. sellowii* L.



Percentual de viabilidade celular do extrato bruto EB obtido das raízes de *J. sellowii* L., sobre macrófagos da linhagem J774, no teste de MTT a uma concentração de 1.0×10^4 cells/ml. Os valores no gráfico representam a média de três experimentos.

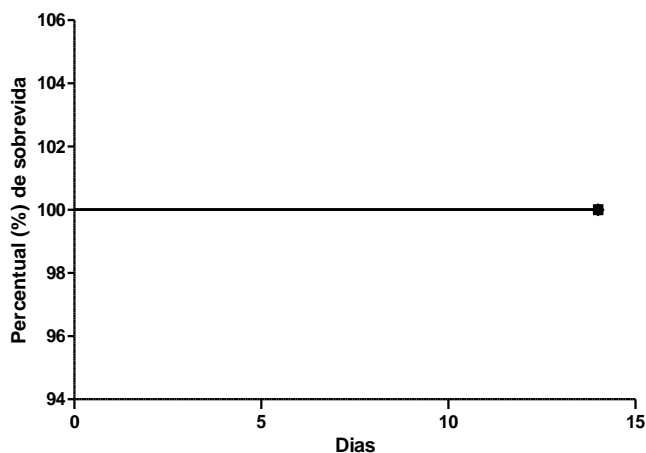
4.4. Teste de toxicidade aguda

Após 14 dias, a administração do EB de *J. sellowii* L. (i.p.) nas doses de 500, 1.000 ou 2.000 mg/kg não causou a mortalidade de qualquer camundongo até a dose máxima utilizada no experimento (Figura 14). Comorbidades foram observadas somente no grupo que recebeu a dose de 2.000 mg/kg nos dois primeiros dias. Os parâmetros observados foram: dificuldade de locomoção, perda de peso, piloereção e diarreia. Após o terceiro dia de observação tais sinais e sintomas foram extintos, ocorrendo a completa recuperação.

Ao final de 14 dias constatou-se que não ocorreu diferença significativa da perda de peso ou alterações de peso nos órgãos vitais (rim, baço, fígado, pulmões) dos grupos de animais tratados com EB em relação ao grupo controle (NaCl, 0,9%) ($p > 0,05$) (resultados não mostrados). Em relação aos parâmetros hematológicos, nenhuma dose (500, 1.000 ou 2.000 mg/kg) de EB de *J. sellowii* L. foi capaz de alterar significativamente algum dos parâmetros hematológicos estudados após 14 dias da administração ($p > 0,05$) (resultados não mostrados).

Com isso os resultados indicam que o EB obtido das raízes de *J. sellowii* L. não causou nenhum dano agudo quando administrado por via (i.p) até a dose de 2.000 mg/kg durante 14 dias de observação. Assim, a administração das doses utilizadas nos experimentos *in vivo* foram consideradas seguras para a avaliação do efeito anti-inflamatório. Além disso, a dose letal (DL50) do EB pode ser estimada a um valor superior a 2000 mg/kg.

Figura 14 - Kaplan Meier - Análise de sobrevida em camundongos.



Curva de sobrevida de animais tratados com diferentes doses (500, 1000, 2000 mg/kg) do EB obtido das raízes de *J. sellowii*. Resultados são apresentados como percentual de sobrevida de 5 animais durante 14 dias de observação.

4.5 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Jungia sellowii* Less. SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E PROTEÍNAS DO EXSUDATO

Na inflamação causada pela Cg, o EB (50 a 200 mg/kg) diminuiu significativamente a migração de leucócitos, variando de $30,02 \pm 3,30\%$ a $56,04 \pm 1,30\%$ em comparação com o grupo controle positivo ($p < 0,01$) (Figura 15A). Nas mesmas doses estudadas este efeito foi associado com a inibição significativa de neutrófilos variando de $45,49 \pm 1,93\%$ a $63,46 \pm 0,90\%$ ($p < 0,01$) (Figura 15B). Também foi observado que o EB nas doses de 50 - 200 mg/kg foi capaz de inibir as proteínas do exsudato variando o percentual de inibição de $27,76 \pm$

4,95% a $44,91 \pm 4,85\%$ ($p < 0,01$) (Figura 15D). No entanto, o mesmo efeito não foi observado em relação às células mononucleares ($p > 0,05$) (Figura 15C).

A fração Aq (25 e 50 mg/kg) apresentou também um efeito anti-inflamatório importante ao inibir a migração de leucócitos (% de inibição: $34,24 \pm 1,93$ a $42,11 \pm 5,17$ ($p < 0,01$) (Figura 16A), e de neutrófilos, ($38,38 \pm 2,44\%$ a $51,95 \pm 4,34\%$) ($p < 0,01$) (Figura 16B). Já nas doses de 10 - 50 mg/kg esta fração demonstrou inibir as proteínas do exsudato, ($41,13 \pm 3,17\%$ a $51,76 \pm 3,04\%$) ($p < 0,01$) (Figura 16C). No entanto, não foi observado nenhuma alteração em relação às células mononucleares ($p > 0,05$) (Figura 16D).

Já as frações BuOH e AcOEt (10 - 25 mg/kg) apresentaram resultados semelhantes, inibindo significativamente a migração de leucócitos, (% de inibição BuOH: $22,98 \pm 4,81\%$ a $36,18 \pm 4,18\%$ ($p < 0,01$) (Figura 17A) (% de inibição AcOEt: $38,96 \pm 4,53\%$ a $41,56 \pm 5,39\%$) ($p < 0,01$) (Figura 18A), sendo esta inibição às custas de neutrófilos, (% de inibição BuOH: $21,58 \pm 4,59\%$ a $31,95 \pm 4,88\%$ ($p < 0,01$) (Figura 17B) e (% de inibição AcOEt: $42,41 \pm 4,86\%$ a $44,45 \pm 6,13\%$ ($p < 0,01$) (Figura 18B). Nas mesmas doses estudadas estas frações foram capazes de reduzir as proteínas do exsudato (% de inibição BuOH: $31,98 \pm 5,79\%$ a $33,30 \pm 6,50\%$ ($p < 0,01$) (Figura 17C) e (% de inibição AcOEt: $34,34 \pm 6,63\%$ a $39,91 \pm 5,17\%$) ($p < 0,05$) (Figura 18C). No entanto, não foi observado nenhuma alteração em relação às células mononucleares para as duas frações estudadas ($p > 0,05$) (Figuras 17D e 18D).

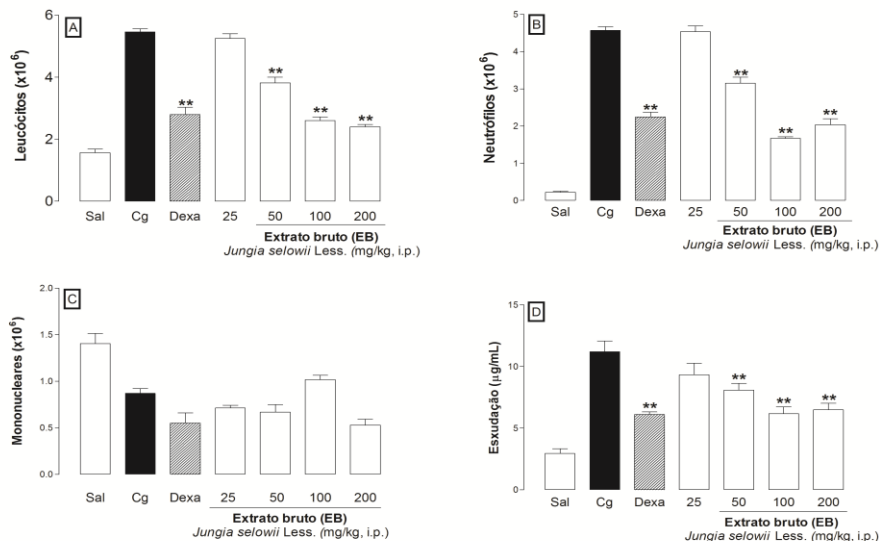
As frações Hexano (Hex) e diclorometano (DCM) inibiram ambas as proteínas do exsudato na dose de (25 mg/kg) ($p < 0,05$), porém não foram capazes de inibir a migração de leucócitos e por este motivo não foram avaliadas em relação a outros parâmetros inflamatórios, como enzimas, citocinas e fatores de transcrição nuclear ($p > 0,05$).

Em relação aos compostos isolados CuR e Pip estes foram obtidos das frações BuOH e AcOEt, respectivamente. Sendo assim nas doses de (5 a 2,5 mg/kg) a CuR inibiu significativamente a migração de leucócitos, (% de inibição $24,89 \pm 4,41\%$ a $26,42 \pm 1,67\%$) e nas doses de (1 a 5 mg/kg) o Pip demonstrou também uma inibição deste parâmetro (% de inibição: $35,89 \pm 4,60\%$ a $49,01 \pm 4,50\%$) ($p < 0,01$) (Figura 19A e 20A). Também foi possível observar que a inibição dos leucócitos ocorreu às custas da inibição de neutrófilos, (% de inibição $40,23 \pm 2,65\%$ a $48,52 \pm 3,39\%$ para a CuR e de $40,23 \pm 2,65\%$ a $48,52 \pm 3,39\%$ para o Pip) ($p < 0,01$) (Figuras 19B e 20B). Ainda, os

compostos inibiram as proteínas do exsudato nas doses de 1 – 5 mg/kg, (% de inibição: $38,93 \pm 2,97\%$ a $65,06 \pm 4,42\%$ para a CuR e nas doses de 0,5 – 5 mg/kg $16,53 \pm 2,67\%$ a $55,42 \pm 2,21\%$ para o Pip) ($p < 0,05$) (Figuras 19D e 20D). Em relação aos mononucleares na dose de 2,5 mg/kg a CuR aumentou a migração destas células, com um percentual de aumento de $47,51 \pm 13,74\%$ ($p < 0,01$) (Figura 19C). Já o piptizol não demonstrou nenhuma alteração em relação às células mononucleares ($p > 0,05$) (Figura 20C).

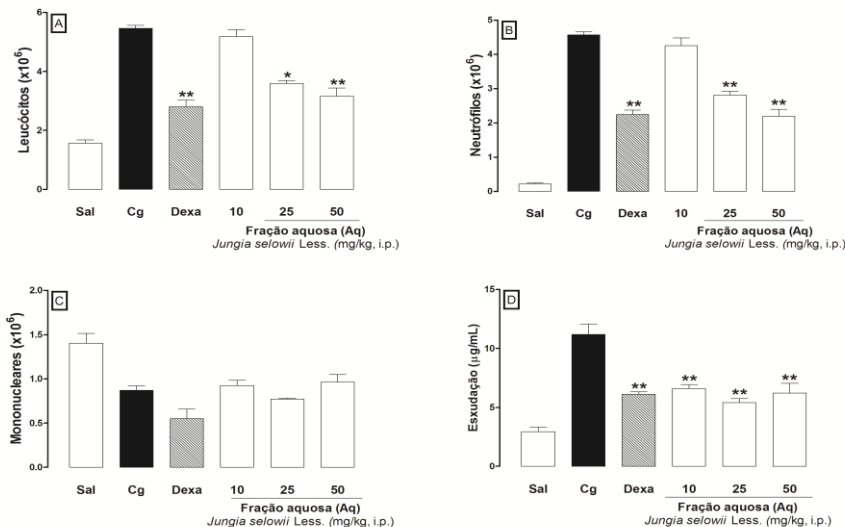
Foi utilizado também para o estudo, o fármaco de referência Dexametasona: 0,5 mg/kg que inibiu significativamente os parâmetros inflamatórios, leucócitos totais, neutrófilos e as proteínas do exsudato ($p < 0,01$) (Figuras 15 a 20).

Figura 15 - Efeito do extrato bruto (EB) (25 - 200 mg/kg) obtido das raízes de *Jungia sellowii* Less., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



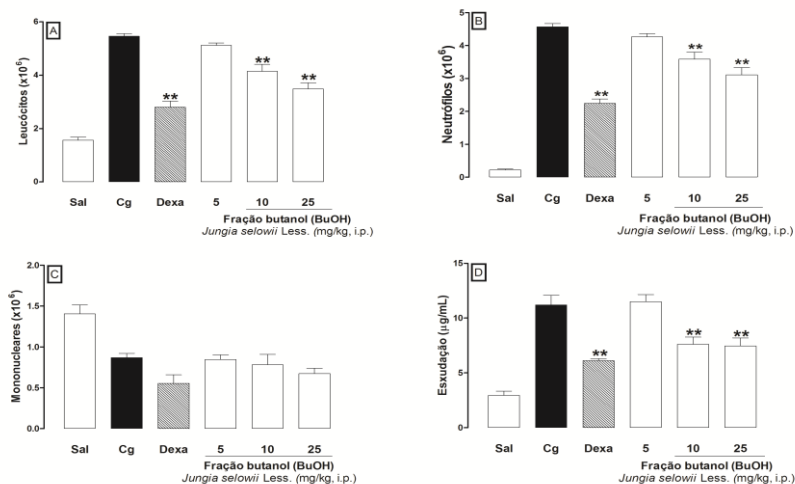
A: Leucócitos, B: neutrófilos, C: mononucleares, D: exudação. Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (ANOVA): Newman-Keuls.

Figura 16 - Efeito da fração aquosa (Aq) (10- 50 mg/kg) obtido das raízes de *Jungia sellowii* Less., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurial (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



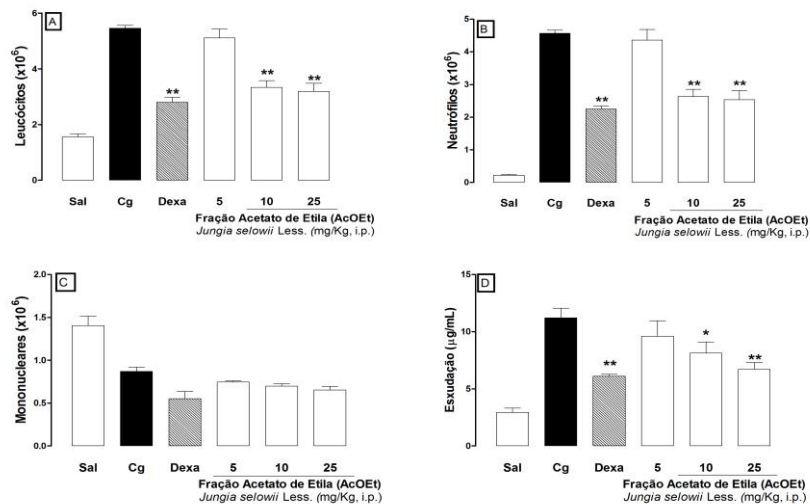
A: Leucócitos, B: neutrófilos, C: mononucleares, D: esudação. Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. * p < 0,05; ** p < 0,01. (ANOVA): Newman-Keuls.

Figura 17 - Efeito da fração butanol (BuOH) (5 - 25 mg/kg) obtido das raízes de *Jungia sellowii* Less., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



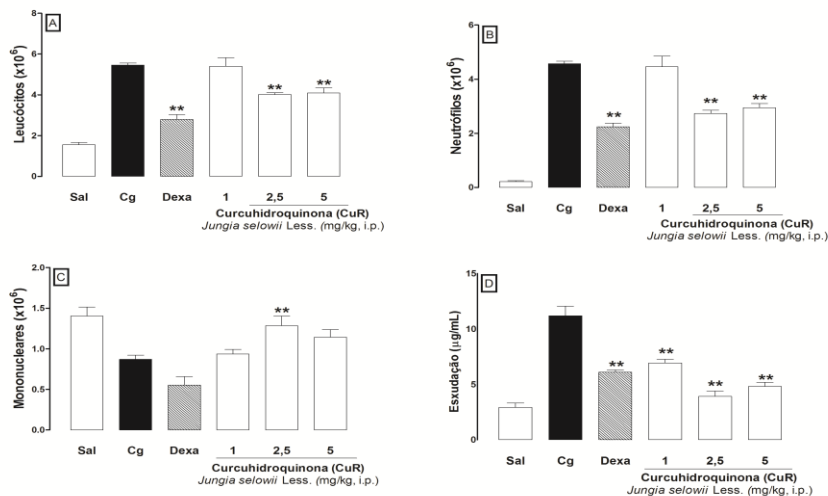
A: Leucócitos, B: neutrófilos, C: mononucleares, D: exudação. Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. * p < 0,05; ** p < 0,01. (ANOVA): Newman-Keuls.

Figura 18 - Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) (5 - 25 mg/kg) obtido das raízes de *Jungia sellowii* Less., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



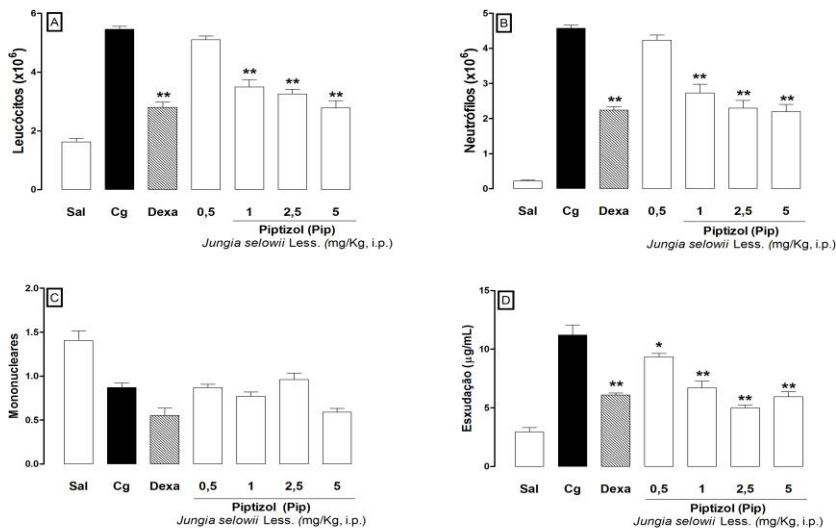
A: Leucócitos, B: neutrófilos, C: mononucleares, D: exudação. Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (ANOVA): Newman-Keuls.

Figura 19 - Efeito da curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR) (1 - 5 mg/kg) obtido das raízes de *Jungia sellowii* Less., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



A: Leucócitos, B: neutrófilos, C: mononucleares, D: esudação. Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (ANOVA): Newman-Keuls.

Figura 20 - Efeito do piptizol (Pip) (0,5 - 5 mg/kg) obtido das raízes de *Jungia sellowii* Less., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



A: Leucócitos, B: neutrófilos, C: mononucleares, D: exsudação. Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. * p < 0,05; ** p < 0,01. (ANOVA): Newman-Keuls.

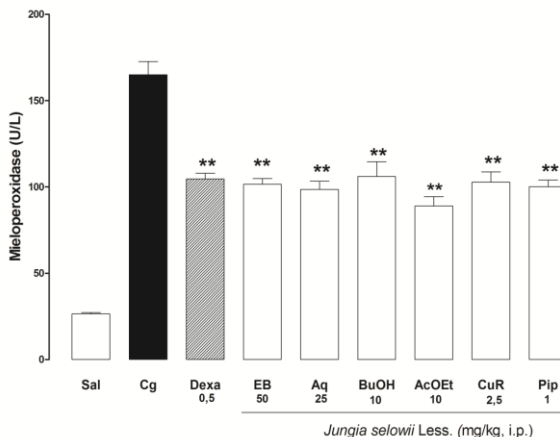
Tabela 3 - Estudo da curva dose resposta e curva tempo resposta no modelo da pleurisia induzida pela carragenina.

<i>Jungia sellowii</i> Less	Doses
Extrato Bruto	50 mg/kg
Fração Aquosa	25 mg/kg
Fração Acetato de Etila	10 mg/kg
Fração Butanol	10 mg/kg
Curcuhidroquinona O-β-glicose	2,5 mg/kg
Piptizol	1 mg/kg
Melhor tempo de pré-tratamento	30 min

4.6 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Jungia sellowii* Less. SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DA MIELOPEROXIDASE

O tratamento prévio (0,5 h) dos animais com o EB, frações e compostos isolados de *J. sellowii* L. reduziram de forma significativa as concentrações de MPO (% de inibição: EB: $36,03 \pm 2,94\%$; Aq: $40,32 \pm 2,93\%$, BuOH: $37,75 \pm 5,21\%$, AcOEt: $46,09 \pm 3,20\%$, CuR: $37,74 \pm 3,63\%$ e Pip: $39,35 \pm 2,30\%$) ($p < 0,01$) (Figura 21). O tratamento com Dexa também reduziu significativamente este parâmetro inflamatório ($p < 0,01$) (Figura 21).

Figura 21 - Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 10 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt 10 mg/kg), curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) obtidos de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre as concentrações da enzima mieloperoxidase (MPO).

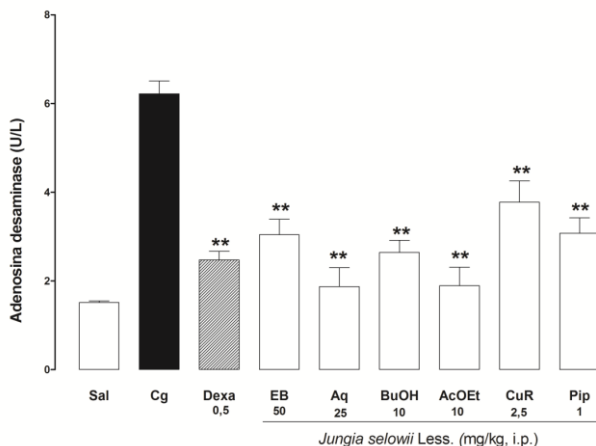


Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexta = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. ** p < 0,01. (ANOVA): Newman-Keuls.

4.7 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Jungia sellowii* Less. SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DA ADENOSINA DESAMINASE

O EB, as frações e os compostos isolados de *J. sellowii* L. também foram capazes de inibir significativamente as concentrações da ADA (% de inibição: EB: 52,09 \pm 5,65%, Aq: 69,91 \pm 6,87%, BuOH: 57,52 \pm 4,39%, AcOEt: 69,59 \pm 6,73%, CuR: 32,03 \pm 3,11% e Pip: 39,35 \pm 2,30%) em comparação com o grupo controle positivo (p < 0,01) (Figura 22). O fármaco de referência, Dexta também reduziu as concentrações desta enzima pró-inflamatória (p < 0,01) (Figura 22).

Figura 22 - Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) obtidos de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre as concentrações da enzima adenosina desaminase (ADA).



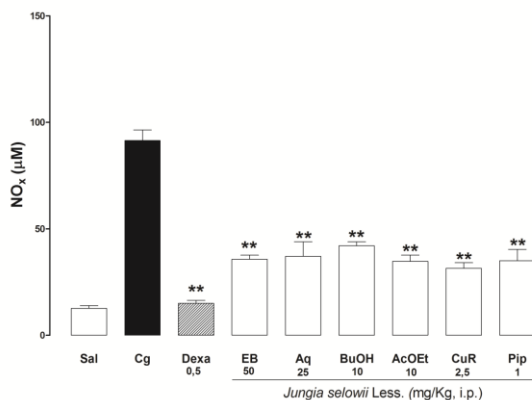
Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. ** $p < 0,01$. (ANOVA): Newman-Keuls.

4.8 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Jungia sellowii* Less. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NITRITO/NITRATO)

O EB, frações polares e compostos isolados de *J. sellowii* L. diminuíram significativamente as concentrações de nitrito/nitrato com um percentual de inibição de EB (50 mg/kg): $60,93 \pm 2,11\%$, Aq (25 mg/kg): $69,91 \pm 6,87\%$, BuOH (10 mg/kg): $57,52 \pm 4,39\%$, AcOEt: $62,04 \pm 3,28$, CuR (2,5 mg/kg): $39,34 \pm 7,74\%$ e Pip (1 mg/kg): $50,60 \pm 5,61\%$, em comparação com o grupo controle positivo ($p < 0,01$) (Figura

23). O fármaco de referência também reduziu as concentrações de nitrito/nitrato ($p < 0,01$) (Figura 23).

Figura 23 - Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) obtidos de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre as concentrações de nitrito/nitrato (NO_x).



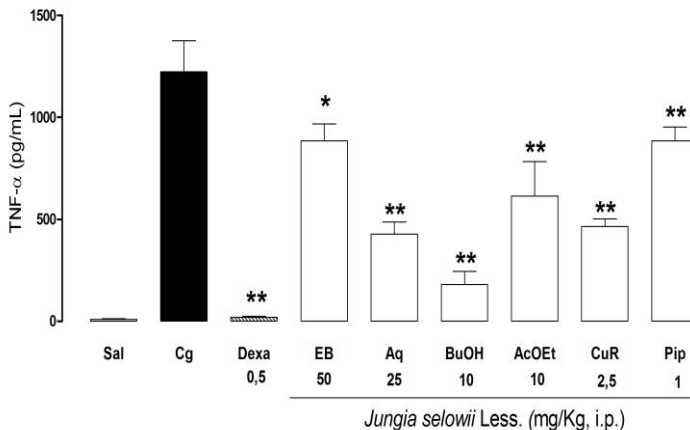
Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. ** $p < 0,01$. (ANOVA): Newman-Keuls.

4.9 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Jungia sellowii* Less. SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-12.

O EB, frações e compostos isolados de *J. sellowii* L. foram capazes de inibir significativamente as concentrações de citocinas pró-inflamatórias no lavado da cavidade pleural, como TNF- α (Figura 24), IFN- γ (Figura 25), IL-6 (Figura 26) e IL-12 (Figura 27) com os seguintes percentuais de inibição: TNF- α : EB (50 mg/kg): $27,66 \pm 2,90\%$, Aq (25 mg/kg): $65,07 \pm 4,94\%$, BuOH (10 mg/kg): $85,33 \pm 5,33\%$, AcOEt (10mg/kg): $49,76 \pm 13,84\%$, CuR (2,5 mg/kg): $61,92 \pm 2,97\%$ e Pip (1 mg/kg): $27,58 \pm 5,52\%$ ($p < 0,01$); IL-12: : EB (50

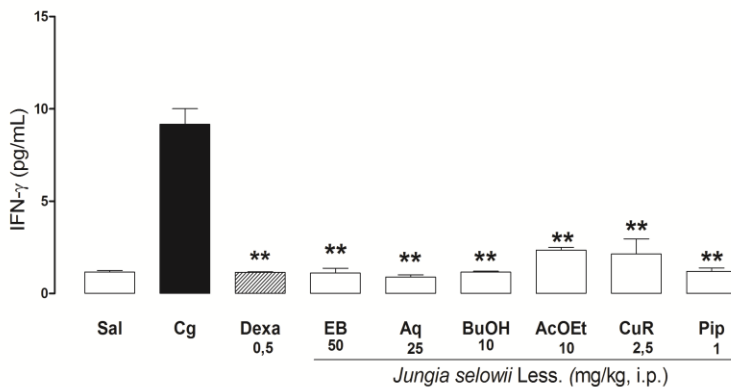
mg/kg): $90,38 \pm 0,85\%$, Aq (25 mg/kg): $91,33 \pm 2,33\%$, BuOH (10 mg/kg): $35,11 \pm 2,98\%$, AcOEt (10mg/kg): $75,10 \pm 3,26\%$ e Pip (1 mg/kg): $73,38 \pm 10,17\%$ ($p < 0,01$); IL 6: EB (50 mg/kg): $86,51 \pm 5,03\%$, Aq (25 mg/kg): $82,90 \pm 8,3\%$, BuOH (10 mg/kg): $96,13 \pm 0,34\%$, AcOEt (10mg/kg): $94,13 \pm 0,70\%$, CuR (2,5 mg/kg): $94,85 \pm 1,60\%$ e Pip (1 mg/kg): $93,63 \pm 2,28\%$ ($p < 0,01$) e IFN- γ : EB (50 mg/kg): $86,61 \pm 2,87\%$, Aq (25 mg/kg): $90,21 \pm 1,15\%$, BuOH (10 mg/kg): $87,40 \pm 0,60\%$, AcOEt (10mg/kg): $74,36 \pm 1,64\%$, CuR (2,5 mg/kg): $76,62 \pm 8,92\%$ e Pip (1 mg/kg) $86,87 \pm 2,02\%$ ($p < 0,01$). O fármaco de referência dexametasona também reduziu as concentrações das respectivas citocinas pró-inflamatórias estudadas ($p < 0,01$) (Figuras 24 a 27).

Figura 24 - Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) obtidos de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre as concentrações do fator de necrose tumoral- α (TNF- α).



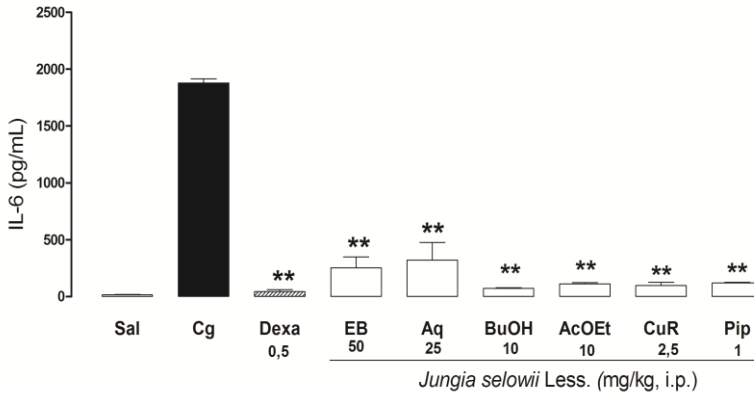
Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (ANOVA): Newman-Keuls.

Figura 25 - Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) obtidos de *Jungia selowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre as concentrações de interferon gamma (IFN- γ).



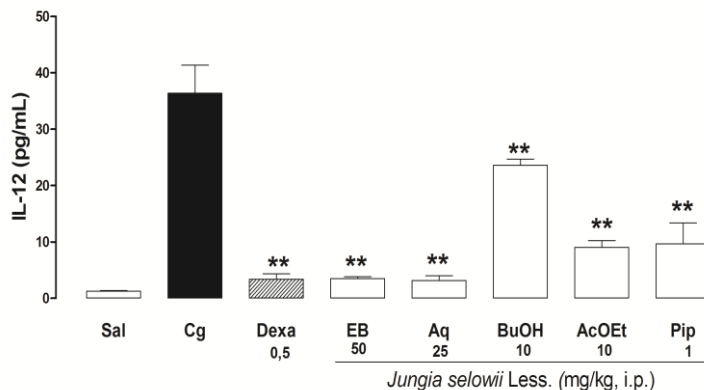
Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. ** p < 0,01. (ANOVA): Newman-Keuls.

Figura 26 - Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg), curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) obtidos de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.) sobre as concentrações da interleucina-6 (IL-6).



Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. ** p < 0,01. (ANOVA): Newman-Keuls.

Figura 27 - Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração aquosa (Aq: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 10 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg) obtidos de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.) sobre as concentrações da interleucina 12 (IL-12).

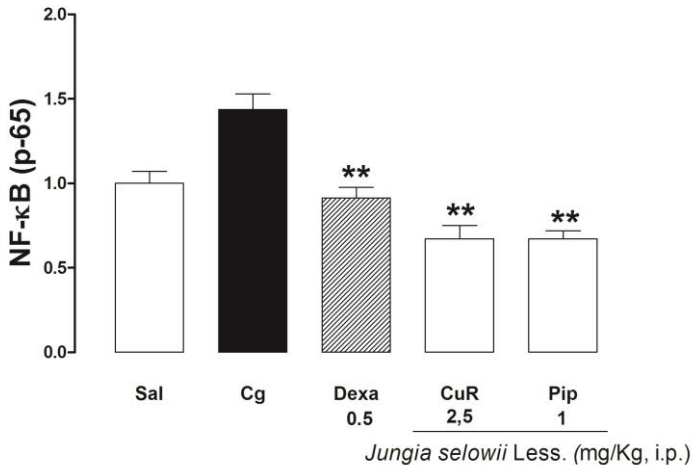


Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. ** p < 0,01. (ANOVA); Newman-Keul

4.10 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *Jungia sellowii* Less. SOBRE A FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA p65 (p-p65-NF-κB).

Para analisar se o efeito anti-inflamatório dos compostos isolados (CuR e Pip) obtidos das raízes de *J. sellowii* L. estariam envolvidos com a ativação de NF-κB, foi realizado o experimento na avaliação da fosforilação da p65 de NF-κB no tecido pulmonar de camundongos. Esta análise revelou que os compostos CuR e o Pip inibiram significativamente a fosforilação de NF-κB, com um percentual de inibição: CuR: $56,80 \pm 5,13\%$ e Pip: $56,88 \pm 4,07\%$ (p < 0,01) (Figura 28). O fármaco de referência dexametasona também inibiu de forma semelhante o parâmetro analisado (Figura 28).

Figura 28 - Efeito dos compostos curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg), isolados da fração butanol (BuOH) e acetato de etila (AcOEt) de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre a fosforilação da proteína p65 (p-p65-NF- κ B).

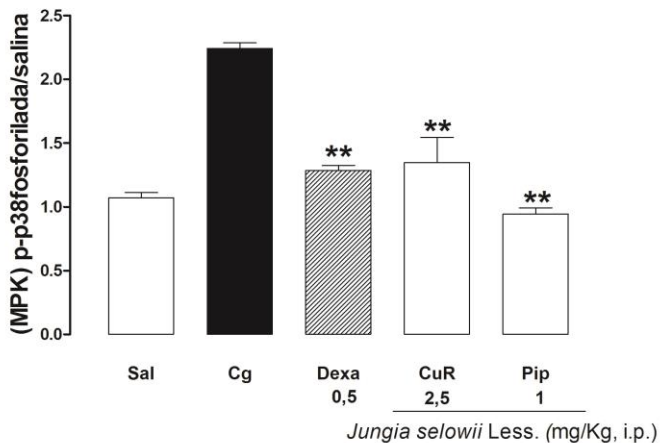


Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (ANOVA): Newman-Keuls.

4.11 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *Jungia sellowii* Less. SOBRE A FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA MPK (p-p-38).

De forma semelhante foi investigado se os compostos isolados poderiam estar envolvidos na via de sinalização das MAPKs, especificadamente em p-p38 MAPK. A inibição foi observada em animais previamente tratados, onde se constatou um percentual de inibição de CuR: $39,83 \pm 11,33\%$ e Pip: $57,91 \pm 2,83\%$ da proteína p38 MAPK fosforilada (Figura 29). O fármaco de referência dexametasona também inibiu de forma semelhante o parâmetro analisado (Figura 29).

Figura 29 - Efeito dos compostos curcuhidroquinona *O*- β -glicose (CuR: 2,5 mg/kg) e piptizol (Pip: 1 mg/kg), isolados da fração butanol (BuOH) e acetato de etila (AcOEt) de *Jungia selowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.) sobre a fosforilação da proteína p38 (p38 MAPK).



Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,9%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média + e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas entre os grupos tratados x Cg. N = 5 animais. ** p < 0,01. (ANOVA): Newman-Keuls.

5. DISCUSSÃO

Vários modelos *in vivo* e *in vitro* foram desenvolvidos com valor experimental e retorno clínico (WEBB, 2014). Estudos associados entre modelos *in vitro* com *in vivo* são valiosos se demonstrarem que um conceito comprovado em um sistema celular é relevante da mesma forma em um animal. Além disso, modelos animais são úteis se as características do processo ou patologia forem diretamente relevantes para os seres humanos. Porém devido à via de administração (oral, i.p), a duração do tratamento, a dosagem, a toxicidade limitante da dose, o metabolismo juntamente com a farmacocinética e a interação do fármaco no seu alvo, presumivelmente sempre ocorre limitações impostas pelos modelos utilizados (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008; WEBB, 2014).

Neste estudo, se observou *in vitro* a capacidade do EB em causar mudanças significativas em macrófagos através da sua exposição no teste de citotoxicidade de MTT. Tal teste tem a finalidade de avaliar a metabolização de sais de tetrazolium por mitocôndrias de células viáveis quando expostas ao agente agressor. Quando as células morrem, elas perdem a capacidade para converter MTT em formazam, favorecendo que com que ele seja precipitado (MOSMANN, 1983).

Células respondem rapidamente ao estresse tóxico alterando taxas metabólicas e o crescimento celular ou mesmo a transcrição genética do controle de suas funções básicas quando expostas a um agente agressor. A "Citotoxicidade" serve como um indicador de efeitos tóxicos agudos importantes para a concepção de estudos *in vitro* mais específicos. Além disso, tais testes fornecem meios rápidos e eficazes de triagem e de classificação de produtos químicos ainda desconhecidos (EISENBRAND et al., 2002; UKELIS et al., 2008).

Assim nosso resultado demonstrou através da curva de citotoxicidade a dose limitante de 580 µg/ml para o EB, definindo-a como a dose que foi capaz de levar a morte de 50% dos macrófagos expostos. Tal dose serve para definir a gama de concentrações para ensaios *in vitro* adicionais e mais detalhados. Ao estabelecer a dose onde 50% das células são afetadas (CC), é possível comparar quantitativamente respostas de vários compostos em um sistema individual sendo que existe razoavelmente uma boa correlação entre a citotoxicidade basal e toxicidade aguda em animais e humanos (EISENBRAND et al., 2002).

Por sua vez a investigação da toxicidade aguda *in vivo*, constitui ainda o primeiro passo na análise de compostos à base de plantas. A

administração sistêmica de qualquer substância tóxica reflete visivelmente na perda do peso corporal dos camundongos além do aumento do peso de órgãos vitais, reflexo da injúria tecidual, hiperplasia, hipertrofia, inflamação e organomegalia frente à exposição a tais substâncias. Sendo assim órgãos como fígado, rins, baço e pulmão são os principais órgãos afetados por reações metabólicas causadas por toxicantes (ADENEYE et al., 2010).

Quando a toxicidade aguda do EB foi analisada *in vivo* observou-se que até 2000 mg/kg não ocorreram óbitos durante os 14 dias após a sua administração, o que parece indicar a natureza não tóxica do extrato até uma dose máxima. O fato do peso relativo dos órgãos vitais como o fígado, pulmão, baço e rins não ter aumentado em relação ao controle salina sugere um grau de toxicidade baixo do extrato até o limite de 2000 mg/kg. Além disso, nenhum parâmetro hematológico avaliado teve alteração significativa no decorrer dos 14 dias e ao final do experimento, sendo que o intervalo normal desses parâmetros pode ser alterado pela ingestão de plantas tóxicas.

Estes resultados *in vitro* e *in vivo* indicam a falta de efeitos tóxicos expressivos das raízes de *J. sellowii* L. e asseguram as doses utilizadas nos experimentos para avaliar a atividade anti-inflamatória da planta em animais.

Em relação à avaliação da atividade anti-inflamatória é importante destacar que o EB e as frações polares Aq, BuOH e AcOEt, além dos compostos isolados CuR e Pip de *J. sellowii* L. demonstraram um importante efeito relacionado com a inibição do influxo de leucócitos do tipo neutrófilos e a uma redução nas concentrações das proteínas do exsudato. A modulação desta resposta foi confirmada com a diminuição significativa nas concentrações de enzimas pró-inflamatórias, como MPO e ADA, além de estar relacionado com a diminuição das concentrações de nitrito e nitrato e de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-6.

As frações BuOH e AcOEt obtiveram um resultado semelhante, uma vez que reduziram a migração de leucócitos e a exsudação em doses de 10 mg/kg, sendo um quinto da dose efetiva do EB (50 mg/kg). Nossos resultados também demonstraram que os compostos isolados de tais frações CuR (2,5 mg/kg) e Pip (1 mg/kg) inibiram em uma dose de 20 a 50 vezes menor que o EB (50 mg/kg), os leucócitos, neutrófilos e as proteínas do exsudato e também os outros parâmetros inflamatórios estudados. Esses resultados também foram observados em comparação com o fármaco de referência, dexametasona.

Atualmente a caracterização química de compostos naturais se torna fundamental a fim de se identificar compostos responsáveis por um efeito farmacodinâmico de interesse e em muitos casos potentes candidatos à protótipos, gerando novos fármacos, com menores efeitos colaterais em relação ao extrato padronizado da planta ou seu uso em forma de infusão (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Corroborando nossos resultados, WILCHES e colaboradores (2015) relacionaram o efeito anti-inflamatório observado da espécie *Jungia rugosa*, típica do Peru, com uma diminuição nas concentrações da enzima MPO em um modelo inflamatório de edema de pata induzido pela carragenina e também em modelo de edema de orelha induzido por TPA em camundongos, demonstrando um resultado bastante similar ao encontrado com a espécie *J. sellowii* L.

A inibição das concentrações da enzima MPO observado nesse trabalho está relacionado à diminuição da ativação de neutrófilos no sítio da inflamação, a diminuição da sua migração e consequente produção também de ROS no local, inibindo assim o processo de injúria tecidual (NAUSEEF, 2014).

Em nosso estudo também se associou um aumento nas concentrações de adenosina extracelular devido à inibição da enzima ADA. Este efeito nos leva a entender que com inibição da enzima ADA leva a uma concentração de adenosina em nível extracelular que consegue por sua vez se ligar a receptores do tipo A_{2A} na membrana de neutrófilos. Nesse caso, ocorre o efeito de inibição da molécula ICAM desses neutrófilos impedindo o seu rolamento e a transmigração para o local inflamado. Por consequência indireta a adenosina promove a diminuição da produção ERO/ERN, mediadores e citocinas que levam a um dano tecidual severo durante a inflamação (ANTONIOLI et al., 2014; YAGO et al., 2015).

Além de inibir as concentrações das enzimas MPO e ADA, o EB, frações e compostos de *J. sellowii* L. demonstraram um papel significativo na fase exsudativa durante o processo inflamatório por diminuir de forma direta a formação de nitrato/nitrito no lavado da cavidade pleural.

A multiplicidade de modelos animais bem caracterizados que mimetizam doenças de caráter inflamatório nas vias aéreas com o uso de camundongos *knockdown* NOx-deficientes permitiu explorar os mecanismos celulares e moleculares dependentes do NOx envolvidos no desenvolvimento e na progressão de doenças inflamatórias e finalmente prever novas abordagens terapêuticas relacionadas. Inibidores de NOx

estão em desenvolvimento sendo um tratamento promissor para doenças das vias aéreas que tem como elemento chave, os neutrófilos (CARNESECCHI; PACHE; BARAZZONE-ARGIROFFO, 2012).

No entanto, até o presente momento, foi comprovado que a deleção do gene iNOS não melhora significativamente a sobrevida de camundongos após trauma ou lesão (LANGE et al., 2010). Sendo assim a abordagem para uma diminuição nas concentrações do óxido nítrico durante o processo inflamatório ainda é um elemento relevante.

Por sua vez, também foi demonstrado neste estudo que a administração sistêmica de *J. sellowii* L. foi capaz de inibir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-12 no lavado da cavidade pleural. As citocinas pró-inflamatórias são liberadas principalmente por neutrófilos ativados e estão associadas tanto no desenvolvimento quanto na amplificação da resposta inflamatória induzida pela carragenina, em camundongos (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1996).

Há também evidências de que as citocinas atuam de forma sinérgica em vez de aditiva, como exemplo, TNF- α e IFN- γ , TNF- α e IL6 ou IL-12 e IFN- γ importantes amplificadores pelo qual medeiam a resposta inflamatória. Assim, bloqueando uma única citocina interrompe-se esta sinergia e se reduz a gravidade de diversas doenças de caráter inflamatório, tal como a asma, artrite reumatóide e o LES (DINARELLO, 2010; TURNER et al., 2014).

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória que exerce suas funções através da ativação de dois receptores distintos, TNFR 1 e TNFR 2. Ambos os receptores podem ativar a via canônica do NF- κ B e a via da JNK cinase, enquanto que o TNFR 2 induz a ativação do NF- κ B pela via não canônica. Todas essas vias atuantes promovem inúmeras alterações na expressão gênica que impulsionam a inflamação, proliferação e sobrevivência celular, além de conduzirem também a morte celular por apoptose ou por necroptose (BLASER et al., 2016; WALLACH, 2016). Assim sugere-se que a redução nas concentrações de TNF- α seja muito importante para a diminuição da progressão da resposta inflamatória principalmente aquela que ocorre nas vias aéreas em modelos murinos de lesão pulmonar, bem como em pacientes asmáticos (STRIZ et al., 2014).

Além disso, outra citocina é a IL-12 que tem como papel chave sustentar uma resposta Th17 pela produção de IL-17 (VIGNALI & KUCHROO, 2012). A IL-17 é uma das principais citocinas capaz de induzir o aumento do influxo de neutrófilos para o local da inflamação,

e gerar um pior prognóstico em pacientes com asma neutrofílica e/ou eosinofílica (NOACK & MIOSSEC, 2014).

Ademais com o bloqueio de IL-12 reduz-se a produção de IFN- γ , que está relacionado a uma resposta inflamatória exacerbada do tipo Th1, podendo assim a IL 12 ser considerada uma citocina de modulação de respostas Th1 e Th17 (SUN et al., 2007; VIGNALI & KUCHROO, 2012).

A IL6 é outra citocina que foi avaliada nesse trabalho. Essa citocina desempenha papel importante na hematopoiese, defesa imunológica e na oncogênese. O aumento na expressão da IL-6 tem sido implicada na patogênese de doenças inflamatórias como a esclerose múltipla, LES, doença inflamatória intestinal, asma, doenças pulmonares, entre outras (NEURATH; FINOTTO, 2011).

A terapia dirigida a IL-6 pode ser considerada um alvo terapêutico validado, visto seu valor como marcador de prognóstico e de evolução em doenças tanto agudas como crônicas (YAO et al., 2014). Sendo assim o bloqueio da ativação do receptor de IL-6 resultaria em diminuição da transcrição STAT-3 promovendo a diminuição da ativação da via JAK ocasionando diminuição da inflamação local e sistêmica através da redução na produção de proteínas de fase aguda como haptoglobina, PCR, proteína amiloide sérica (A), entre outros (SCHELLER et al., 2011; SCHAPER; ROSE-JOHN, 2015).

Neste mesmo quadro inflamatório o alto dano oxidativo e a retroalimentação descontrolada de citocinas promovem a ativação de fatores de transcrição, tais como NF- κ B e o fator de transcrição AP-1, importantes agentes os quais desempenham a indução de uma resposta inflamatória contínua a nível transcricional (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; SANTOS et al., 2014).

Assim a fim de demonstrar o mecanismo de ação anti-inflamatória observado de *J. sellowii* L. relacionou-se a atividade observada aos compostos isolados CuR e Pip agindo a nível transcricional na modulação da inflamação. Dessa maneira foi verificado que CuR e Pip exercem uma função específica ao inibir a fosforilação de duas proteínas intracelulares, a proteína p65 de NF- κ B e a proteína p38 MAPK, sendo considerado esse um passo fundamental para diminuir o processo inflamatório e a infiltração de neutrófilos no lavado da cavidade pleural (NOURSHARGH et al., 2016; PERES et al., 2016).

Corroborando nossos dados, pesquisas desenvolvidas em nosso laboratório relacionadas às folhas de *J. sellowii* L., demonstraram o papel de dois compostos obtidos da fração aquosa, o ácido succínico e

ácido láctico demonstrando uma inibição da via do NF- κ B (NADER et al., 2014).

Além disso, não menos importante a via da p38 MAPK regula a quimiotaxia de neutrófilos através de quimiocinas (CXCL8, CXCL2) e leucotrieno B4 (LTB4). A avaliação na expressão de marcadores de superfície de neutrófilos (CD11b, CD66b) e receptores como (CXCR1) sugerem o envolvimento da expressão da cascata de p38 MAPK na ativação e quimiotaxia de tais células (KIM; HAYNES, 2013).

Inibidores de p38 MAPK já demonstraram possuir propriedades anti-inflamatórias em modelos animais. Estes inibidores mostraram reduzir o influxo de neutrófilos em resposta à peritonite induzida por urato ou carragenina (FOUDA et al., 1995) e à artrite induzida por colágeno (GRISWOLD et al., 1988, 1989).

Dentro ainda desse contexto, outro estudo demonstrou que a inibição da via p38 MAPK promoveu a diminuição da migração de neutrófilos, a liberação de TNF- α e o acúmulo de neutrófilos no local da resposta inflamatória quando feito a administração de LPS intratecal em camundongos. Por sua vez a relação da inibição da p38 MAPK e a diminuição de células mononucleares não foi significativamente observado (NICK et al., 2000).

Tais resultados demonstram uma dependência da ativação de p38 MAPK e a quimiotaxia de neutrófilos sugerindo que esta via pode modular o influxo de neutrófilos para o local da inflamação (GUPTA; NEBREDA, 2015).

É importante ressaltar que este trabalho relata o estudo *in vivo* inédito de dois compostos naturais isolados: a CuR e o Pip. A CuR é um composto natural e estruturalmente novo onde está pela primeira vez sendo descrito, contudo, sua forma aglicona é um sesquiterpeno bisaboleno isolado pela primeira vez de uma espécie da planta Gorgônia caribense *Pseudopterogorgia rigida* por MCENROE e FENICAL (1978). Esta é uma das substâncias responsáveis pelas propriedades antibióticas da espécie (MCENROE; FENICAL, 1978; JENSEN et al., 1996), e sua função em corais marinhos tem como objetivo deter a predação por peixes (HARVELL; FENICAL; GREENEE, 1988).

Recentemente PARK e colaboradores (2014) isolaram dos rizomas de *Curcuma xanthorrhiza* uma molécula glicosilada semelhante, a curcu hidroquinona 2,5-di-*O*- β -D-glucopiranosídeo a qual atribuíram a capacidade de prevenir o envelhecimento cutâneo mediado por luz ultravioleta (UVB), demonstrando o papel anti-inflamatório e antioxidante na prevenção do eritema, edema e alterações cutâneas

mediadas pela redução da expressão de RNA mensageiro de metaloproteinases-1 (MMP-1) em queratinócitos humanos.

Já o Pip, encontra-se na planta tanto como uma mistura epimérica de dois isômeros: o α e β piptzol. Sendo que a mistura epimérica do Pip é descrito como um produto de transformação da perezona, obtido através de seu rearranjo térmico (REMFROY, 1913; WALLS et al., 1966). Para os derivados da perezona já foram descritas algumas atividades, como exemplo a capacidade antioxidante de tais moléculas (LOZADA et al., 2012).

Para o piptizol o primeiro relato de isolamento foi através das raízes da planta *Perezias cuernavacana* considerado como um derivado sesquiterpeno (WALLS et al, 1965; GREEN; PETTUS, 2011). Porém, apesar dessa molécula ser conhecida há tanto tempo, ainda não existem dados de alguma atividade biológica descrito na literatura sobre a mesma.

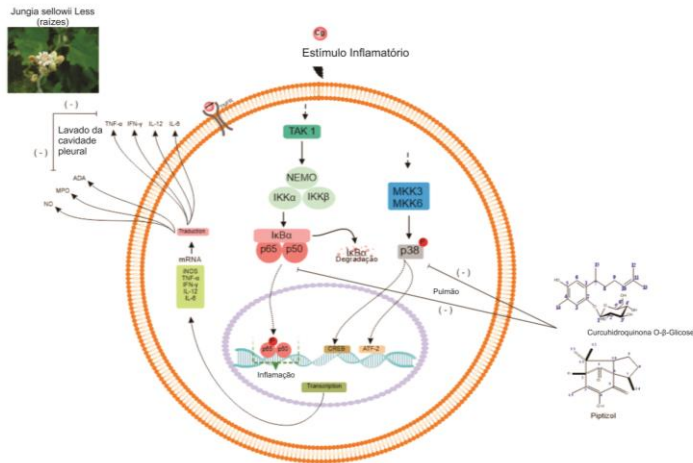
Neste contexto os compostos CuR e o derivado trixano isolado Pip, mostram-se possíveis escolhas como marcador químico da espécie, uma vez que tais compostos estão sendo estes descritos pela primeira vez, isolados das raízes de uma planta.

Neste estudo, também se comparou o efeito anti-inflamatório dos compostos isolados de *J. sellowii* L. com o fármaco de referência dexametasona, um potente glicocorticóide envolvido com múltiplas vias de inibição do processo inflamatório. De acordo com os resultados, os dois compostos demonstram efeito anti-inflamatório similar à dexametasona em relação a todos os parâmetros inflamatórios estudados.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez o perfil toxicológico de *J. sellowii* L., *in vitro* e *in vivo*, assegurando todas as doses utilizadas nos experimentos. Além disso, foi demonstrado o efeito anti-inflamatório das raízes de *J. sellowii* L. em um modelo agudo de inflamação pulmonar *in vivo*. Os compostos isolados CuR e Pip são substâncias primeiramente descritas exercendo um papel em inibir cascatas inflamatórias intracelular, como do NF- κ B e da p38 MAPK, vias essenciais que desencadeiam o processo inflamatório (Figura 30).

Figura 30 – Resumo gráfico dos efeitos de *Jungia sellowii* Less sobre os mediadores inflamatórios estudados.



ATF-2: Proteína transcricional dependente de monofosfato de adenosina; Cg: carragenina; CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta ao monofosfato cíclico de adenosina; NEMO: proteína inibitória *kappa* B quinase; IKK α : Proteína inibitória *kappa* B quinase alpha; IKK β : Proteína inibitória *kappa* B quinase beta; IKB α : subunidade inibitória do NF-KB; p65 e p50: subunidades (RelA e RelB de NF-KB); MKK3 e MKK6: proteína quinase dupla induzida por mitógeno; p38: proteína quinase ativada por mitógeno; MPO: mieloperoxidase; ADA: adenosina desaminase; NO: óxido nítrico; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IFN- γ : interferon gamma; IL-12: interleucina 12 e IL-6: interleucina 6. **Fonte:** Marcus Vinicius P.S. Nascimento, José Ednilson Júnior.

7. REFERÊNCIAS

- ADENEYE, A. A. et al. EVALUATION OF THE TOXICITY AND REVERSIBILITY PROFILE OF THE AQUEOUS SEED. **Afr J Tradit Complement AlternMed.** v. 7, p. 350–369, 2010.
- AMOR, S. et al. Inflammation in neurodegenerative diseases - an update. **Immunology**, v. 142, n. 2, p. 151–166, 2014.
- ANTONIOLI, L. et al. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? **Drug Discov Today**, v. 19, p. 1051-1068, 2014.
- ANTONIOLI, L. et al. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. **Nat Rev Cancer**, v.13, n. 12, p. 842-857, 2013.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J.. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, n. 1, p. 92 - 106, 2010.
- ASHWELL, J. D.. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 7, p. 532–540, 2006.
- AZEVEDO, L. et al. Three new trixane glycosides obtained from the leaves of *Jungia sellowii* Less . using centrifugal partition chromatography, **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, 2016.
- BAEUERLE, P. A.; BALTIMORE, D.. Nf- κ B: Ten years after. **Cell**, v. 87, n. 1, p. 13–20, 1996.
- BALKWILL, F. R.; BURKE, F.. The cytokine network. **Immunology Today**, v. 10, n. 9, p. 299–304, 1989.
- BARLETTA, K.E.; LEY, K.; MEHRAD, B.. Regulation of Neutrophil Function by Adenosine. **Arteriosclerosis Thromboses Vascular Biology**,v.32, p.856-864, 2012.
- BARNES, P.J.. Inhaled Corticosteroids. **Pharmaceuticals**, v. 3, p. 514 - 540, 2010.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. **Artmed: Porto Alegre**, 3ed., p. 205-206, 2015.

BHARGAVA, M.; WENDT, C. H.. Biomarkers in acute lung injury. **Translational Research**, v. 159, n. 4, p. 205–217, 2015.

BLASER, H. et al. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 4, p. 249–261, 2016.

BLUME, C.; DAVIES, D.E.. *In vitro* and *ex vivo* models of human asthma. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 84, p. 394–400, 2013.

BOGDAN, C.. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 3, p. 161–178, 2015.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.. Naturally occurring terpene derivatives. Part 88. Constituents of tribe Mutisieae. **Phytochemistry**, v. 16, n. 2, p. 239-242, 1977.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.. New types of sesquiterpenes from the subtribe Nassauviinae Edited by Marekov, N.; Orahovats, A. from **Symp. Pap. – IUPAC Int. Symp. Chem. Nat. Prod.** 11th, v. 4, p. 171-179, 1978.

BOHLMANN, F. et al. Naturally occurring terpene derivatives. Part 474. A tetracyclic sesquiterpene, further isocedrene, and guaiene derivatives from *Jungia stuebelii*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 5, p. 1201-1206, 1983.

BOHLMANN, F. et al. Polyacetylene compounds from *Jungia seteriana*. **Planta Medica**, v. 50, n. 2, p. 190-191, 1984.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; LE VAN, N.. Naturally occurring terpene derivatives. Part 168, New geranylcoumarin derivatives and further constituents of the tribe Mutisiaeae. **Phytochemistry**, v. 18, n. 1, p. 99-102, 1979.

BOLDIZSAR, F. et al. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. **Immunobiology**, v. 215, n. 7, p. 521 - 526, 2010.

BOLZANI, V. DA SILVA. et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure Appl. Chem**, v. 84, p.1837–1846, 2012.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of investigative dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982.

BRENNER, D. et al. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 6, p. 362-74, 2015.

BRITO, F.D.. Pleurisy and pouch models of acute inflammation. In: Liss, A.A.R. (Ed.), *Pharmacological methods in the control of inflammation*. Rhone Poulenc, Dagenham, p. 173 - 228, 1989.

BRUSOTTI, G. et al. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. *J. Pharm Biomed Anal*, v.87, p.218-28, 2014.

BUSS, A.D.; WAIGH, R.D.. Natural products as leads for new pharmaceuticals, in: M.E. Wolff (Ed.), *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*. **Principles and practice**, v. 1, p. 983–1033, 1995.

CARNESECCHI, S.; PACHE, J.-C.; BARAZZONE-ARGIROFFO, C.. NOX enzymes: potential target for the treatment of acute lung injury. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 69, p. 2373-85, 2012.

CARVALHO A.C. et al. Regulation of herbal medicines in Brazil. **J. Ethnopharmacol**, v.2, p.158, 2014.

CASADO, R. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Jungia paniculata*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48 n. 8, p. 897-905, 2010.

CHUNG, K. F.. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma. **The Lancet**, v. 386, n. 9998, p. 1086–1096, 2015.

CORTÉS, A. et al. Moonlighting adenosine deaminase: a target protein for drug development. **Med Res Rev**, v. 35, n. 1, p. 85–125, 2015.

CRAGG, G.M., GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J.. New Horizons for Old Drugs and Drug Leads. **J Natural Products**. 2014.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.. Natural products: a continuing source of novel drug leads, **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CUI, D. et al. Efficacy and safety of interferon- γ -targeted therapy in Crohn's disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol**, v. 37, p. 507–513, 2013.

CUZZOCREA, S. et al. Protective effects of n-acetylcysteine on lung injury and red blood cell modification induced by carrageenan in the rat. **The FASEB Journal**, v.15, p.1187–1200, 2001.

D'AGOSTINO, M. et al. Flavonol glycosides from *Jungia panicullata*. **Fitoterapia**, v. 66, n. 3, p. 283-284.

DAI, P.; HARADA, Y.; TAKAMATSU, T.. Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 56, n. 3, p. 166–170, 2015.

DA-CHENG H.; XIAO-JIE G.; PEI-GEN, X.. Phytochemical and biological research of Papaver pharmaceutical resources. **Medicinal Plants**, p. 217–251

DANNHARDT, G.; KIEFER, W.. Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 109 - 126, 2001.

DE-LA-CRUZ, H.; VILCAPOMA, G.; ZEVALLOS, P. A.. Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 284-294, 2007.

DINARELLO, C. A.. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 935–950, 2010.

- DITTRICH, A. et al. Systems biology of IL-6, IL-12 family cytokines. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 26, p. 595–602, 2015.
- DONATH, M. Y.. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes. **Diabetes Obesity Metabolic**, v. 15 Suppl 3, n. 6, p. 193–196, 2013.
- DURAI PANDIYAN, V.; AYYANAR, M.; IGNACIMUTHU, S.. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Palyar tribe from Tamil Nadu, India. **BMC Complement Altern. Med**, v. 6, p. 35–41, 2006.
- DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, 2016.
- EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2–3, p. 193–236, 2002.
- FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R.. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ. Health Perspect**, v.109, p.69–75, 2001.
- FAITH, M. et al. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? **Clinica Chimica Acta**, v. 396, n. 1–2, p. 23–25, 2008.
- FARAG, M. A.; PARÉ, P. W.. Phytochemical Analysis and Anti-inflammatory Potential of *Hyphaene thebaica* L. Fruit. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 10, p. 1503-1508, 2013.
- FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P.. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 2, p. 153–164, 2007.
- FLAMMER, J.R.; ROGATSKY, I. Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. **Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 7, p. 1075 - 1086, 2011.

FOUDA, B. I. et al. Effect of lipopolysaccharide on mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A2. **J. Biochem.** v. 308, p.815, 1995.

FRANÇA-SILVA, M.S. et al. Organic nitrates: past, present and future. **Molecules**, v. 19, p. 15314-15323, 2014.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S.. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflamm**, v. 10, p. 223-227, 2001.

GIRODET, P.O. et al. Ca²⁺-Activated K⁺ channel-3.1 blocker TRAM-34 attenuates airway remodeling and eosinophilia in a murine asthma model. **Am J Respire Cell Mol Biol**, v. 48, n. 2, p. 212-219, 2013.

GIUSTI, G.; GALANTI, B.. Adenosine deamisase: colorimetric method. In: BERGMAYER, H. U. **Methods os enzymatic analysis**. New York: Verlac Chemie, p. 315-323, 1984.

GOLENIOWSKI, M. E. et al. Medicinal plants from the “Sierra de Comechigones”, Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, p. 324-341, 2006.

GOSSLAU, A. et al. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 55, p. 74-82, 2011.

GREEN, I. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GREEN, J. C.; PETTUS, T. R. R.. An oxidative dearomatization-induced [5 + 2] cascade enabling the syntheses of α -cedrene, α -pipitzol, and sec -cedrenol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 5, p. 1603-1608, 2011.

GRISWOLD, D. E. et al. Effect of inhibitors of eicosanoid metabolism in murine collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum.** v.31, p.1406, 1988.

GRISWOLD, D. E. et al. Inhibition of inflammatory cell infiltration by bicyclic imidazoles. **Inflammation**, v.13, p.727, 1989.

GROVER, J.K.; YADAV, S.; VATS, V.. Medicinal plants of India with antidiabetic potential, **Journal Ethnopharmacology**, v. 81, p. 81–100, 2002.

GUPTA, J.; NEBREDA, A. R.. Roles of p38 mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. **FEBS Journal**, v. 282, n. 10, p. 1841–1857, 2015.

HAMMOND, G. B. et al. A survey of tradicional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash,Perú. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 17-30, 1998.

HARVELL, C. D.; FENICAL, W.; GREENEE, C. H.. Chemical and structural defenses of caribbean gorgonians (*Pseudopterogorgia* spp.). I. Development of an in situ feeding assay. **Mar. Ecol.Prog. Ser.**, v.49, p. 287-294, 1988.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S.. Shared Principles in NF- κ B Signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344–362, 2008.

HAYDEN, M.; GHOSH, S.. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. **Seminary's immunology**, v. 26, n. 3, p. 253–266, 2014.

HAYNES, R.K. et al. Considerations on the mechanism of action of artemisinin antimalarials: part 1--the 'carbon radical' and 'heme' hypotheses. **Infect Disord Drug Targets**, v. 13(4), p. 217-77, 2013.

HEADLAND, S.E.; NORLING, L.V.. The resolution of inflammation: Principles and a challenges. **Semi Immunology**, v. 27, p. 149-160, 2015.

HEADLAND, S.E.; NORLING, L.V.. The resolution of inflammation: Principles and a challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, p. 149-160, 2015.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A.. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular cancer**, v. 12, n. 1, p. 86, 2013.

HOFFMANN, N. et al. Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2504 - 2514, 2005.

JENSEN, P. R. et al. Antimicrobial activity of extracts of Caribbean gorgonian corals. **Marine Biology**, v. 125, n. 2, p. 411–419, 1996

JIANG, J. et al. Lactic acid inhibits lipopolysaccharide-induced translocation of NF- κ B p65 from cytoplasm to nucleus and transcription of nuclear factor- κ B p65 and cyclooxygenase 2. **Acta Anatomical Sinica**, v. 44, n. 2, p. 204-209, 2013.

JOZWIAK-BEBENISTA, M.; NOWAK, J.Z.. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. **Acta Pol Pharm**, v. 71, n. 1, p. 11-23, 2014.

JURG, A.; TOMAS, T.; PIVIDAL, J.. Antimalarial activity of some plant remedies in use in Marracuene, southern Mozambique, **Journal Ethnopharmacology**, v.33, p.79–83, 1991.

KHALID, H. et al. Efferth, Gems from traditional north-African medicine: medicinal and aromatic plants from Sudan. **Nat. Prod. Bioprospect**, v.2, p.92–103, 2012.

KOBAYASHI, Y.. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **Journal Leukocyte Biology**, v. 88, p. 1157-1162, 2010.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P.. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 159-175, 2013.

LAINE, L. et al. Systematic review: the lower gastrointestinal adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Aliment Pharmacology Therapy**, v. 24, n. 5, p. 751-67, 2006.

LANGE, M. et al. Role of different nitric oxide synthase isoforms in a murine model of acute lung injury and sepsis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, n. 2, p. 286–291, 2010.

LARKIN III, J. et al. Regulation of interferon gamma signaling by suppressors of cytokine signaling and regulatory T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 18, n. 4, p. 1-8, 2013.

LAWRENCE, T.. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 2009.

LEWKOWICH, I.P.; WILLS-KARP, M.. Animal models of allergen-induced asthma. In: Middleton's allergy: principles and practice. 7. ed. London: Elsevier, p. 437 - 450, 2008.

LIMA, G.R.M. et al. Database Survey of Anti-Inflammatory Plants in South America: A Review. **Int. J. Mol. Sci.** v.12, p.2692-2749, 2011.

LONTCHI-YIMAGOU, E. et al. Diabetes mellitus and inflammation. **Current Diabetes Reports**, v. 13, n. 3, p. 435–444, 2013.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-267, 1951.

LOZADA, M.C. et al. **Synthesis, cytotoxic and antioxidant evaluations of amino derivatives from perezone**. Bioorgan. Med. Chem., v. 20, p. 5077-5084, 2012.

MARCHANT, R. et al. Distribution and ecology of parent taxa of pollen lodged within the Latin American Pollen Database. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 121, p. 1-75, 2002.

MATTEI, R. A.; DALMARCO, E. M.; FRODE, T. S.. Etanercept administration prevents the inflammatory response induced by carrageenan in the murine air pouch model. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 12, p. 1247–1257, 2015.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R.. Animal models of acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 295, n. 3, p. L379–99, 2008.

MCENROE, F. J.; FEICAL, W.. Structures and synthesis of some new antibacterial sesquiterpenoids from the gorgoniann coral *Pseudopterogorgia rigida*. **Tetrahedron**, v.34, p.1661-1664, 1978.

MCGETTIGAN, P.; HENRY, D.. Cardiovascular risk with non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review of population-based controlled observational studies. **PLoS Med**, v. 8, n9, p. e1001098.

MCKIM, J. M. et al. The common food additive carrageenan is not a ligand for Toll-Like- Receptor 4 (TLR4) in an HEK293-TLR4 reporter cell-line model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 153–158, 2015.

MEDZHITOV, R.. Review Article Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 24, p. 428 - 435, 2008.

MEDZHITOV, R.; HORNG, T.. Transcriptional control of the inflammatory response. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 10, p. 692 - 703, 2009.

MILLER, L.H.; SU, X.. Atermisinin: Discovery from the Chinese herbal garden. **Cell**, v.146, p.855–858, 2011.

MINCIULLO, P. L. et al. Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, p. 1–16, 2015.

MOKRA, D.; KOSUTOVA, P.. Biomarkers in acute lung injury. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 159, p. 355-377, 2015.

MONGE, M.. *Jungia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB104601>. Acesso em: 11 set. 2015.

MOSMANN, T.. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NADER, M. et al. *Jungia sellowii* suppresses the carrageenan-induced inflammatory response in the mouse model of pleurisy. **Inflammopharmacology**, 22(6), 351–365, 2014.

NAUSEEF, W.M.. Myeloperoxidase in human neutrophil host defense. **Cell Microbiology**, v. 8, p. 1146–1155, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R.. 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. **Natural Products Report**, v. 30, n. 4, p. 584-592, 2013.

NICK, J.A. et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in a murine model of pulmonary inflammation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 4, p. 2151–9, 2000.

NOACK, M.; MIOSSEC, P.. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 6, p. 668–677, 2014.

NOBEL PRIZE.. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2015**. Nobel Media AB. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/>. Data de acesso: 06/12/2015.

NOURSHARGH, S.; RENSHAW, S.A.; IMHOF, B.A.. Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why?. *Trends in Immunology*, p. 1-14, 2016.

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

OLIVEIRA, D. T.; SOUZA-SILVA, E.; TONUSSI, C. R.. Technical Report: Gingival Vein Punction: A New Simple Technique for Drug Administration or Blood Sampling in Rats and Mice. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, v. 36, n. 2, p.109-113, 2009.

PALOMINO, D.C.T; MARTI, L.C. Chemokines and immunity. **Einstein**, v. 13, n. 3, p. 469-473, 2015.

PARK, J. et al. New bisabolane sesquiterpenes from the rhizomes of *Curcuma xanthorrhiza* ROXB. and their inhibitory effects on UVB-induced MMP-1 expression in human keratinocytes. **Helv Chim Acta**, v. 97, p.438-446, 2014.

PARK, W.Y. et al. Cytokine Balance in the Lungs of Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. n. 17, p. 1896–1903, 2001.

PASTUHOV, S.I. et al. MAP kinase cascades regulating axon regeneration in *C. elegans*. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**. v. 91, n. 3, p. 63-75, 2015.

PERES, R. S. et al. Pharmacological opportunities to control inflammatory diseases through inhibition of the leukocyte recruitment. **Pharmacological Research**, p. 1–11, 2016.

PETRONILHO, F. et al. Ebselen Attenuates Lung Injury in Experimental Model of Carrageenan-Induced Pleurisy in Rats, **Inflammation**, v.38 (4), p.1394-400, 2015.

PRAJAPATI, V.D. et al. Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. **Carbohydr Polym**, v. 105, p. 97-112, 2014.

PREDONZANI, A. et al. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. **World J Exp Med**, v. 5, n. 2, p 64-76, 2015.

QUAX, R. A. et al. Glucocorticoid sensitivity in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v.9, n. 11, p. 670-686, 2013.

RAO, P.; KNAUS, E.E.. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 2, p. 81s - 110s, 2008.

RAO, T.S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, p. 723-741, 1993.

RATH, T. et al. From physiology to disease and targeted therapy: interleukin-6 in inflammation and inflammation associated carcinogenesis. **Arch Toxicol**, v. 89, p. 541–554, 2015.

REHECHO, S. et al. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a part of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas, Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p. 75-85, 2011.

REMFREY, F.G.P.. Perezone. **J chem soc, trans**, v. 103, p. 1076-1088, 1913.

RIOS, J.L.; FRANCINI, F.; SCHINELLA, G.R.. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **Planta Medica**, v.81, p. 975–994, 2015.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y.S.. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 811-819, 1996.

SANTOS, L. A. M. et al. Diethylcarbamazine inhibits NF- κ B activation in acute lung injury induced by carrageenan in mice. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 153–162, 2014.

SCHAPER, F.; ROSE-JOHN, S.. Interleukin-6: biology, signaling and strategies of blockade. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 26, p. 475–487, 2015.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W.. Analysis of Inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.8(1), p.93–151, 2006.

SCHURGERS, E. et al. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon- γ . **Journal Interferon Cytokine Res**, v. 31, n. 12, p. 917-926, 2011.

SEDGWICK, A.D.; LEES, P.. A comparison of air pouch, songe and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents and Actions**, v. 18, n. 3-4, p. 439 - 446, 1986.

SHARMA, S.B; GUPTA, R.. Drug Development from Natural Resource: A Systematic Approach. **Mini Rev Med Chem**, v.15, n.1, p.52-7, 2015.

SLUTSKY, A. S.; RANIERI, V. M. Ventilator-induced lung injury. **The New England journal of medicine**, v. 369, n. 22, p. 2126–36, 2013.

STEIN, J. et al. Non-eosinophilic airway hyper-reactivity in mice, induced by IFN- γ producing CD4⁺ and CD8⁺ lung T cells, is responsive to steroid treatment. **Scand J Immunol**, v. 80, n. 5, p. 327-38, 2014.

STENKEN, J. A.; POSCHENRIEDER, A. J.. Bioanalytical chemistry of cytokines--a review. **Analytica chimica acta**, v. 853, p. 95–115, 2015.

STRIZ, I. et al. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 126, n. 9, p. 593–612, 2014.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y.. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. **Pharmacological Reports**, v. 59, n. 3, p. 247 - 258, 2007.

SUN, K. et al. Interleukin-12 promotes gamma interferon-dependent neutrophil recruitment in the lung and improves protection against respiratory *Streptococcus pneumoniae* infection. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 3, p. 1196–1202, 2007.

SUN, L. et al. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 249–255, 2015.

TANGNITIPONG, S. et al. Extracellular Heme Enhances the Antimalarial Activity of Artemisinin. **Biol. Pharm Bull.** v.35 (1), p.29-33, 2012.

TRINCHIERI, G.. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133–46, 2003.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, 2014.

UKELIS, U. et al. Replacement of in vivo acute oral toxicity studies by in vitro cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 51, n. 1, p. 108–118, 2008.

VANDEVYVER, S. et al. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. **Endocrinology**, v 154, n. 3, p. 993–1007, 2013.

VIGNALI, D. A A; KUCHROO, V. K.. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature Immunology**, v. 13, n. 8, p. 722–728, 2012.

WALLACH, D.. The cybernetics of TNF: Old views and newer ones. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 50, p. 105–114, 2016.

WALLS, P. et al. The structure of α and β piptzols. **Tetrahedron Lett**, n. 21, p. 1577-1502, p. 1965.

WALTZ, P. et al. Nitrate/nitrite as critical mediators to limit oxidative injury and inflammation. **Antioxidant Redox Signal**, v. 23, n. 4, p. 328–339, 2015.

WEBB, D. R.. Animal models of human disease: Inflammation. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 121–130, 2014.

WILCHES, I. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of the methanolic extract from *Jungia rugosa* leaves in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.15, p.166-71, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO-AFRO), African Traditional Medicine Day, n. 31 August Special issue. The African Health Monitor, 2010, Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>>. Acesso em: 16/02/2016.

XU, G-Y. et al. Lactic Acid Reduced LPS-Induced TNF- α and IL-6 mRNA levels Through Decreasing I κ B α Phosphorylation. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 12, n.6, p. 1073-1078, 2013.

YAGO, T. et al. Multi-Inhibitory Effects of A2A Adenosine Receptor Signaling on Neutrophil Adhesion Under Flow. **The Journal of Immunology**, v. 195, p. 3880-3889, 2015.

YANG, Y. et al. Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. **Mediators Inflamm**, 2014.

YAO, X. et al. **Pharmacology & Therapeutics**, v.141, p.125-139, 2014.

YBARRA, M. I. et al. A cyperane and trixanes from *Jungia polita*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3627-3629, 1992.

ZELOVA, H.; HOSEK, J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. **Inflamm Res**, v. 62, p.641–651, 2013.

ZHANG T. et al. Mast cell stabilisers. **European Journal of Pharmacology**, v.778, p.158-168, 2016.

ZUNDLER, S.; NEURATH, M. F.. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 5, p. 559–568, 2015.

ANEXO 1
Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00757

Título

Metodologias utilizadas no laboratório de pesquisa em Imunologia para ensaios in vivo

Data de Entrada

24/04/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

01/06/2012

Considerações

Ofício nº 44/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Tânia Silvia Fröde, Departamento de Análises Clínicas - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

A CEUA solicita a alteração do método de punção retro-orbital. Esta via não é adequada para injeção intravenosa de substâncias, mesmo sob anestesia. A aprovação do protocolo está condicionada a implementação de outra via para administração intravenosa, de baixo dano tecidual. Verificar na página da CEUA um método adequado e comunique qual será implementado.

Os procedimentos elencados no parecer final estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: cinco mil seiscientos e dezesseis camundongos (*Mus musculus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 05/09/2016

Data 05/06/2012



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

APÊNDICE

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO: ANTI-INFLAMMATORY PROFILE OF *JUNGIA SELLOWII* LESS., ON CARRAGEENAN-INDUCED ACUTE PLEURAL CAVITY INFLAMMATION IN MICE. PERIÓDICO: PHYTOTHERAPY RESEARCH.



Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to Phytotherapy Research

Manuscript ID PTR-16-1497

Title Anti-inflammatory profile of *Jungia setlowii* Less., on carrageenan-induced acute pleural cavity inflammation in mice.

Authors Vicente, Geison
Kinoshita Moon, Yeo Jim
Rosa, Daniela
Azevedo, Luísa
Abel Saleh, Najla
da Rosa, Julia
Vigi de Mello, Sílvia
Bianchi, Marque
Frode, Tânia

Date Submitted 02-Dec-2016

ARTIGOS PUBLICADOS EM PARCERIA

- 1) DA ROSA, JS; DE MELLO, SVG; **VICENTE, G**; MOON, YJK; DALTOÉ, FP; LIMA, TC; DE JESUS SOUZA, R; BIAVATTI, MW; FRÖDE, TS.. *Calea uniflora* Less. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **International Immunopharmacology**, v. 42, p. 139-149, 2017.
- 2) VIGIL DE MELLO, SVG; DA ROSA, JS; FACCHIN, BM; LUZ, ABG; **VICENTE, G**; FAQUETI, LG; ROSA, DW; BIAVATTI, MW; FRÖDE, TS.. Beneficial effect of *Ageratum conyzoides* Linn (Asteraceae) upon inflammatory response induced by carrageenan into the mice pleural cavity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 1, p. 115-126, 2016.
- 3) NADER, M.; **VICENTE, G**; DA ROSA, JS; LIMA, TC; BARBOSA, AM; SANTOS, ADC; BARISON, A; DALMARCO, EM; BIAVATTI, MW; FRÖDE, TS.. *Jungia sellowii* suppresses the carrageenan-induced inflammatory response in the mouse model of pleurisy. **Inflammopharmacology** (Dordrecht. Print), v. 22, p. 1568-5608, 2014.
- 4) DE ANDRADE, KR; DE CASTRO, GRW; **VICENTE, G**; DA ROSA, JS; NADER, M; PEREIRA, IA; FRÖDE, TS.. Evaluation of circulating levels of inflammatory and bone formation markers in axial spondyloarthritis. **International Immunopharmacology**, v. 21, p. 481-486, 2014.
- 5) REIS, GO; **VICENTE, G**; CARVALHO, FK; HELLER, M; MICKE, G; PIZZOLATTI, MG; FRÖDE, TS.. *Croton antisiphiliticus* Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **Inflammopharmacology** (Dordrecht. Print), v. 22, p. 115-126, 2014.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

- 1) **VICENTE, G;** MOON, Y. J. K.; LIMA, L. A.; ROSA, J. S.; MELLO, S. V. G. V.; BIAVATTI, M.; FRODE, T. S.. ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF *JUNGIA SELLOWII* LESS., IN CARRAGEENAN-INDUCED ACUTE LUNG INFLAMMATION IN MICE.. IN: SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNOLOGIA - SBI, CAMPOS DO JORDÃO, 2016.
- 2) ROSA, J. S.; VIGIL DE MELLO, S.V.G.; **VICENTE, G.**; LIMA, T.C.; BIAVATTI, M.; FRODE, T.S.. EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF THE DICHLOROMETHANE FRACTION AND ISOLATED COMPOUND: NOREUGENIN FROM *CALEA UNIFLORA* LESS. IN IN VIVO EXPERIMENTS. In: SBI, 2016.
- 3) VIGIL DE MELLO, SVG; **VICENTE, G;** BOSI, C.; ROSA, D.; BIAVATTI, M.; FRODE, T. S. . EVIDENCIAS DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA FRAÇÃO ETANOL E COMPOSTOS ISOLADOS OBTIDOS DA *AGERATUM CONYZOIDES* NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA. In: FESBE, 2015.
- 4) **VICENTE, G;** NADER, M.; LIMA, T. C.; BARBOSA, A.M.; BIAVATTI, M.; FRODE, T. S.. PHARMACOLOGICAL STUDY OF *JUNGIA SELLOWII* LESS. USING THE PLEURISY MODEL INDUCED BY CARRAGENAN, IN MICE.. In: FESBE, SÃO PAULO. 2015.
- 5) ROSA, J. S. ; **VICENTE, G.**; MOON, Y. J. K. ; LIMA, T. C. ; BIAVATTI, M. ; FRODE, T. . MODULATION OF INFLAMMATORY RESPONSE OF *CALEA UNIFLORA* LESS IN THE MURINE PLEURISY MODEL INDUCED BY CARRAGENAN. IN: FESBE, 2015.
- 6) FRODE, T.; NADER, M.; **VICENTE, G.** ; ROSA, J. S.; BIAVATTI, M.. MODULATION OF THE INFLAMMATORY RESPONSE INDUCED BY CARRAGENAN IN A MURINE MODEL BY EFFECT OF

JUNGIA SELLOWII LESS. IN: THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, 2014.

- 7) **VICENTE, G.**; MOON, Y. J. K. ; MELLO, S. V. G. V.; LUZ, A.B. G.; FACCHIN, B. M. C. ; BOSI, C. F. ; ROSA, D. W. ; BIAVATTI, M.W.; FRODE, T. S. . ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *AGERATUM CONYZOIDES* L. UTILIZANDO-SE O MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO NEUTROFÍLICA NA CAVIDADE PLEURAL INDUZIDA PELA CARRAGENINA.. IN: SEMINÁRIO INICIAÇÃO CIENTÍFICA - SIC, 2014, FLORIANÓPOLIS.
- 8) ROSA, J. S.; **VICENTE, G.**; LIMA, T. C.; BIAVATTI, M. W. ; FRODE, T. S.. PHARMACOLOGICAL STUDY OF *CALEA UNIFLORA* LESS IN A MURINE MODEL OF PLEURISY INDUCED BY CARRAGENAN. In: FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, CAXAMBU, 2014.
- 9) FRODE, T. S.; ANDRADE, K. R ; CASTRO, G. ; **VICENTE, G.** ; ROSA, J. S ; NADER, M. . EVALUTION OF CIRCULATING LEVEL OF INFLAMMATORY AND BONE FORMATION MARKERS IN AXIAL SPONDYLOARTHRITIS. IN: AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, CHICAGO, 2014.
- 10) NADER, M.; **VICENTE, G.** ; BIAVATTI, M. W. ; BABOSA, M. A. ; FRODE, T. . PHARMACOLOGICAL STUDY OF *JUNGIA SELLOWII* LESS. IN A MURINE MODEL OF PLEURISY INDUCED BY CARRAGEENAN.. IN: 11TH WORLD CONGRESS ON INFLAMMATION AND XXXVIII CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY, NATAL, 2013.
- 11) **VICENTE, G.**; REIS, G. O.; KANUMFRE, F.; PIZZOLATTI, M. G.; FRODE, T. . ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *CROTON ANTISYPHILITICUS* MART. NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS.. IN: SEMINÁRIO

DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - SIC, FLORIANÓPOLIS,
2013.

- 12) **VICENTE, G.**; REIS, G. O. ; KANUMFRE, F.; PIZZOLATTI, M. G.; FRODE, T.. ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *CROTON ANTISYPHILITICUS* MART. NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS.. IN: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, FLORIANÓPOLIS, 2012.
- 13) REIS, G. O.; **VICENTE, G.**; FRODE, T.; PIZZOLATTI, M. G.; KANUMFRE, F.. EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF AQUEOUS FRACTION AND ISOLATED FLAVONOIDS FROM *CROTON ANTISYPHILITICUS* MART. IN *IN VIVO* EXPERIMENTS. IN: XXXVII CONGRESS OF THE BRAZILIAN IMMUNOLOGY SOCIETY, 2012, CAMPOS DE JORDÃO, 2012.
- 14) **VICENTE, G.**; REIS, G. O. ; POZZATI, P. ; HORST, H. ; PIZZOLATTI, M. G. ; FRODE, T. . ESTUDO DA EFICÁCIA DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES OBTIDAS DA *ESENBECKIA LEIOCARPA* (RUTACEAE) NO MODELO PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS. IN: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, FLORIANÓPOLIS, 2011,.
- 15) REIS, G. O.; **VICENTE, G.**; FRODE, T.; PIZZOLATTI, M. G. ; KANUMFRE, F. . EVIDENCE OF ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS FROM THE CRUDE EXTRACT AND FRACTIONS OBTAINED FROM *CROTON ANTISYPHILITICUS* MART. IN A MURINE CARRAGEENAN-INDUCED MODEL. IN: IMMUNOFOZ - XXXVI BRAZILIAN CONGRESS OF IMMUNOLOGY, 2011, FOZ DO IGUAÇU. ANAIS DO XXXVI BRAZILIAN CONGRESS OF IMMUNOLOGY, 2011.

APRESENTAÇÕES ORAL DE TRABALHOS

- 1) **VICENTE, G.;** NADER, M. ; LIMA, T.C; BIAVATTI, M. ; BARBOSA, A.M; FRODE, T. . PHARMACOLOGICAL STUDY OF *JUNGIA SELLOWII* LESS. USING THE PLEURISY MODEL INDUCED BY CARRAGENAN, IN MICE.. 2015. (APRESENTAÇÃO DE TRABALHO/CONGRESSO).
- 2) **VICENTE, G..** ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *CROTON ANTISYPHILITICUS* MART. NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS.. 2013. (APRESENTAÇÃO DE TRABALHO/SEMINÁRIO).
- 3) **VICENTE, G.;** REIS, G. O. ; POZZATI, P. ; HORST, H. ; PIZZOLATTI, M. G. ; FRODE, T. . ESTUDO DA EFICÁCIA DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES OBTIDAS DA *ESENBECKIA LEIOCARPA* (RUTACEAE) NO MODELO PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS. 2011. (APRESENTAÇÃO DE TRABALHO/SEMINÁRIO).