



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA – PPGFAR**

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DA *Jungia sellowii* Less.,
UTILIZANDO O MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA
CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS**

MESTRADO

Marina Nader

**Florianópolis
2014**

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

Marina Nader

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DA *Jungia sellowii* Less.,
UTILIZANDO O MODELO 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

Área de Concentração: Fármaco-medicamentos.

Linha de Pesquisa: Mecanismos moleculares e celulares envolvidos em processos fisiopatológicos.

Florianópolis
2014

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

Nader, Marina

ESTUDO FARMACOLÓGICO DA *Jungia sellowii* Less.,
UTILIZANDO O MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA
CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS / Marina Nader ;
orientadora, Tânia Silvia Fröde – Florianópolis, SC, 2014.
119 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Farmácia. 3. Efeito anti-inflamatório.
4. *Jungia sellowii* Less.. 5. Produtos Naturais. I. Fröde,
Tânia Silvia. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Dedico esta dissertação aos meus pais, a minha irmã e ao meu namorado que, sempre me estimularam a dar este grande passo. Estas pessoas com muita sabedoria e dedicação estiveram ao meu lado, me encorajando e me guiando nesta busca incessante pelo conhecimento. Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sandra e Saliba, e à minha irmã Camila meu infinito agradecimento por sempre me incentivarem e apoiarem a alcançar objetivos cada vez mais distantes.

Ao meu namorado, Mauricio Leonardo Gobbi, por me acompanhar em mais uma jornada, me apoiando e ajudando a superar todos os desafios com muito amor e paciência.

À minha orientadora Profa. Dr. Tânia Silvia Fröde, por todo empenho, sabedoria e confiança e ao professor Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, por sua ajuda e interesse.

À minha amiga Julia Salvan da Rosa, companheira de laboratório e parceira para todas às horas. Obrigada por todo apoio, por me ensinar muito do que sei hoje no laboratório, pelos momentos de descontração, festas, estresse e aprendizado.

Ao meu aluno de iniciação científica, meu amigo, Geison Vicente, pelas horas de experimentos e conversas. Obrigada por tudo, sua ajuda foi fundamental!

Aos meus amigos de laboratório: Ziliani da Silva Buss, Patricia P. Wanzeller, Rafael de Liz, Silvana Vigil de Mello, Gustavo Oliveira dos Reis, Bruno Matheus Facchin, entre outros, obrigada pelas horas boas e não tão boas que passamos juntos e por todo companheirismo.

À professora do departamento de Farmácia: Maique Weber Biavatti e suas alunas: Alyne Machado Barbosa e Tamires Cardoso Lima, obrigada por realizarem todas as análises fitoquímicas necessárias.

Às professoras Ariane Zamoner Pacheco de Souza, Tânia C. Pasa, Thaís Critstine Marques Sincero e seus grupos de pesquisa, por fornecer toda a sua estrutura laboratorial e apoio em alguns experimentos. Muito obrigada!

À Coordenadora do PGFAR, professora Dra. Tânia B. C. Pasa, à vice-coordenadora, Simone G. Cardoso e ao secretário Bruno W. Farias, obrigada por toda a ajuda durante o curso.

À UFSC, ao PGFAR e a CAPES agradeço por possibilitar a realização do presente trabalho.

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

RESUMO

Introdução: *Jungia* é um gênero da família Asteraceae, que compreende arbustos, cipós e ervas e está presente na América do Norte, Central e América do Sul, incluindo o sul do Brasil, onde a espécie *Jungia sellowii* Less. é encontrada no estado de Santa Catarina. Este gênero é utilizado na medicina popular para tratar inflamação no trato urinário, tonsilite, úlceras estomacais, nefrite, hemorroidas e também é utilizado como um agente desinfetante para tratar infecções genitourinárias. **Objetivos:** Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto (EB), frações e compostos isolados de *Jungia sellowii* Less. (Asteraceae), administrados por via intraperitoneal (i.p.), utilizando-se o modelo murino da pleurisia induzida pela carragenina. **Metodologia:** Folhas frescas foram extraídas com etanol e água para obtenção do EB, que foi fracionado com diferentes solventes de polaridade crescente obtendo-se as frações *n*-hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), *n*-butanol (BuOH) e a fração residual aquosa (Aq). O ácido succínico (AS) e o ácido láctico (AL) foram isolados da fração Aq e suas estruturas foram determinadas por ressonância magnética nuclear (¹H RMN). Camundongos albinos Swiss, fêmeas, foram utilizados nos experimentos *in vivo*. O modelo experimental da pleurisia foi induzido por uma injeção intrapleural de Cg (1%) e os parâmetros inflamatórios: migração de leucócitos, concentração de exsudação, atividade da mieloperoxidase (MPO) e adenosina desaminase (ADA), bem como as concentrações dos metabólitos do óxido nítrico (NO_x), interleucina-1 (IL-1β), fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e interleucina-17A (IL-17A) foram analisados no lavado da cavidade pleural dos camundongos. A expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para IL-1β, TNF-α, IL-17A e também para a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a avaliação da fosforilação da proteína p65 (p-p65 Fator Nuclear-κB (NF-κB)) foram determinadas no tecido pulmonar após 4 h da indução da pleurisia. Diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias, complementado pelo teste de Newman-Keuls. Valores de p < 0.05 foram considerados significativos. **Resultados:** Animais tratados com EB (25-50 mg/kg), BuOH (25-50 mg/kg), Aq (5-25 mg/kg), AS (1-2.5 mg/kg) e AL (1-2.5 mg/kg) inibiram a migração

de leucócitos e a concentração de exsudação. O EB (25 mg/kg), BuOH (25 mg/kg), Aq (5 mg/kg), SA (1 mg/kg) e LA (1 mg/kg) inibiram a atividade da MPO e da ADA, as concentrações de NO_x, IL-1β, TNF-α, IL-17A, bem como a expressão do RNAm para IL-1β, TNF-α, IL-17A e iNOS. O AS e o AL inibiram a fosforilação da proteína p65 (p-p65 NF-κB) (p < 0.05).

Conclusão: Os resultados demonstraram que *Jungia sellowii* Less. inibiu a inflamação induzida pela carragenina pela diminuição da migração de leucócitos e da exsudação. Estes efeitos foram relacionados à inibição de citocinas pró-inflamatórias e do óxido nítrico. Ainda, os compostos isolados, AS e AL, podem ter um papel importante neste efeito anti-inflamatório pela inibição de todos os parâmetros inflamatórios estudados e sua ação anti-inflamatória pode estar relacionada à regulação do NF-κB.

Palavras-chave: *Jungia sellowii* Less., pleurisia, efeito anti-inflamatório, enzimas pró-inflamatórias, citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico, NF-κB, ácido láctico e ácido succínico.

ABSTRACT

PHARMACOLOGICAL STUDY OF *Jungia sellowii* Less., USING THE PLEURISY MODEL INDUCED BY CARRAGENAN, IN MICE

Introduction: *Jungia* is a genus from the Asteraceae family, which comprises shrubs, lianas and herbs and it is present in the North America, Central America and South America, including southern Brazil, where the species *Jungia sellowii* Less. is found in the state of Santa Catarina. This genus is used in traditional medicine to treat urinary tract inflammation, tonsillitis, stomach ulcers, nephritis, hemorrhoids and it is also used as a disinfectant agent to treat genitourinary infections. **Objectives:** To evaluate the anti-inflammatory effect of the crude extract (CE), its derived fractions and isolated compounds from *Jungia sellowii* Less. (Asteraceae), administered intraperitoneally (i.p.), using a murine model of pleurisy induced by carrageenan. **Methodology:** Fresh leaves were extracted with ethanol and water to obtain the CE which was fractionated with different solvents of increasing polarity, yielding *n*-hexane (Hex), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH) fractions and the residual aqueous fraction (Aq). The succinic acid (SA) and lactic acid (LA) were isolated from the Aq fraction and their structures were determined by nuclear magnetic resonance (^1H NMR). Female Swiss mice were used in the *in vivo* experiments. The experimental model of pleurisy was induced by an intrapleural injection of Cg (1%) and the inflammatory parameters: leukocyte content, degree of exudation, myeloperoxidase (MPO) and adenosine deaminase (ADA) activities, as well as nitric oxide metabolites (NO_x), interleukin- 1β (IL- 1β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-17A (IL-17A) levels were analyzed in the mouse pleural fluid leakage. The messenger ribonucleic acid (mRNA) expression for IL- 1β , TNF- α , IL-17A and also for inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the measurement of p65 protein phosphorylation (p-p65 Nuclear Factor- κB (NF- κB)) were determined in the lung tissue after 4 h of pleurisy induction. Statistical difference between groups were determined by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. **Results:**

Animals treated with CE (25-50 mg/kg), BuOH (25-50 mg/kg), Aq (5-25 mg/kg), SA (1-2.5 mg/kg) and LA (1-2.5 mg/kg) inhibited leukocyte content and the degree of exudation. The CE (25 mg/kg), BuOH (25 mg/kg), Aq (5 mg/kg), SA (1 mg/kg), and LA (1 mg/kg) inhibited MPO and ADA activities, NO_x, IL-1 β , TNF- α , IL-17A levels, as well as the mRNA expression for IL-1 β , TNF- α , IL-17A and iNOS and the p65 protein phosphorylation (p-p65 NF- κ B) ($p < 0.05$). **Conclusions:** The results demonstrated that *Jungia sellowii* Less. inhibited the inflammation induced by carrageenan by decreasing the leukocyte content and the degree of exudation. Those effects were related to the inhibition of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide. Also, the isolated compounds, SA and LA, may play an important role in this anti-inflammatory effect by inhibiting all the studied pro-inflammatory parameters and its anti-inflammatory action may be related to the regulation of NF- κ B.

Keywords: *Jungia sellowii* Less., pleurisy, anti-inflammatory effect, pro-inflammatory enzymes, pro-inflammatory cytokines, nitric oxide, NF- κ B, lactic acid and succinic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem da <i>Jungia sellowii</i> Less.....	33
Figura 2 - Mecanismo de ação da mieloperoxidase (MPO) no processo inflamatório.....	37
Figura 3 - Mecanismo de ação da adenosina desaminase (ADA) no processo inflamatório.....	39
Figura 4 - Proposta de mecanismo de ação do óxido nítrico (NO) sintetizado por macrófagos via óxido nítrico sintase induzida (iNOS) no processo inflamatório.....	41
Figura 5 - Esquema de ativação da via canônica do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B).....	45
Figura 6 - Via do ácido araquidônico e mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs).....	47
Figura 7- Vias de sinalização genômica e não-genômica dos glicocorticoides em células T.....	48
Figura 8 - Perfil temporal do modelo da pleurisia induzida pela carragenina (Cg) em camundongos.....	50
Figura 9 - Diagrama da sequência de obtenção do extrato bruto, frações, e compostos isolados das folhas de <i>Jungia sellowii</i> Less.....	55
Figura 10 - Estruturas químicas dos compostos isolados a partir da fração aquosa das folhas de <i>Jungia sellowii</i> Less.....	56
Figura 11 - Modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	60
Figura 12 - Espectro RMN de ^1H da sub-fração E (400 MHz, metanol-d-(4) (MeOD)), mostrando o ácido láctico (1) e o ácido succínico (2).....	72

Figura 13 Espectro RMN de 1H sobreposto dos compostos ácido láctico (1) e o ácido succínico (2) (400 MHz, água deuterada (D2O)), mostrando os sinais correspondentes a cada hidrogênio.....72

Figura 14 - Efeito do extrato bruto (EB) (10 - 50 mg/kg) obtido das folhas 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.....75

Figura 15 - Efeito da fração butanol (BuOH) (10 - 50 mg/kg) obtida das folhas 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.....76

Figura 16 - Efeito da fração aquosa (Aq) (1 - 25 mg/kg) obtida das folhas 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.....77

Figura 17 - Efeito do ácido succínico (AS) (1 – 2,5 mg/kg) obtido da fração aquosa 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.....78

Figura 18 - Efeito do ácido láctico (AL) (1 – 2,5 mg/kg) obtido da fração aquosa 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.....79

Figura 19 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....80

Figura 20 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 atividade da enzima adenosina desaminase (ADA).....81

Figura 21 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 concentração de nitrito/nitrato (NO_x).....82

Figura 22 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 concentração de interleucina-1 β (IL1 β).....84

Figura 23 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 concentração de fator de necrose tumoral- α (TNF- α).....85

Figura 24 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 concentração de interleucina-17A (IL-17A).....86

Figura 25 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 expressão do RNAm para a interleucina-1 β (IL-1 β).....88

Figura 26 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 expressão do RNAm para o fator de necrose tumoral- α (TNF- α).....89

Figura 27 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 expressão do RNAm para interleucina-17A (IL-17A).....90

Figura 28 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 expressão do RNAm para a óxido nítrico sintase induzida (iNOS).....91

Figura 29 - Efeito dos compostos ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg), isolados da fração aquosa (Aq) 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 a fosforilação da proteína p65 (p-p65-NF-κB).....92

Figura 30 - Resumo do efeito anti-inflamatório de *Jungia sellowii* Less. no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos (iniciadores) e condições utilizadas nas reações de RT-PCR.....	69
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1 - Receptor A1 de adenosina

A2A - Receptor A2A de adenosina

A2B - Receptor A2B de adenosina

A3 - Receptor A3 de adenosina

ABTS⁺ - 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico)

AcOEt - fração acetato de etila

ADA - adenosina desaminase

AINEs - anti-inflamatórios não esteroidais

AL - ácido láctico

ANOVA - análise de variância

Aq - fração aquosa

AS - ácido succínico

BAFFR - fator de ativação de células B

BuOH - fração *n*-butanol

CCDA - cromatografia em camada delgada analítica

CD - *cluster of differentiation* = marcadores de diferenciação celular

CD4⁺ - Proteína de superfície expressa em linfócitos T auxiliares

CD8⁺ - Proteína de superfície expressa em linfócitos T citotóxicos

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

CE - *crude extract*

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

Cl⁻ - íon cloreto

CLV - cromatografia líquida a vácuo

Cg - carragenina

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX - ciclooxigenase
CXCL - quimiocina ligante cisteína-X-cisteína
CV - coeficiente de variação
D₂O - água deuterada
DCM - fração diclorometano
DEPC - dicarbonato de dietila
Dexa - dexametasona
DMSO - dimetilsulfóxido
DNA - ácido desoxirribonucleico
DNAse - Enzima desoxirribonuclease
dNTPs - desoxirribonucleotídeos fosfatados
DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTT - DL-ditiotreitol
EB - extrato bruto
ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
eNOS/NOS3 - óxido nítrico sintase constitutiva
e.p.m. - erro padrão da média
ERN - espécie reativa de nitrogênio
EtBr - brometo de etídio
EtOAc - *ethyl acetate fraction*
EUA - Estados Unidos da América
GC - glicocorticoide
G-CSF - fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

GR - receptor de glicocorticoide
GRE - elementos responsivos aos glicocrticóides
HCl - ácido clorídrico
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
Hex - fração *n*-hexano
HOCL - ácido hipocloroso
ICAM-1 - molécula de adesão intracelular-1
IFN- α - interferon alpha
IFN- β - interferon beta
IFN- γ - interferon gama
IkB- α - I kappa B-alfa = Subunidade inibitoria do fator de transcricao nuclear NF-Kb
IkB- β - I kappa B-beta = Subunidade inibitoria do fator de transcricao nuclear NF-Kb
IkB- γ - I kappa B-gama = Subunidade inibitoria do fator de transcricao nuclear NF-Kb
IKK - I kappa B kinase
IL - interleucina
IL-1R - receptor de interleucina-1
IL-1Ra - antagonista do receptor de IL-1
Indo - indometacina
iNOS/NOS2 - óxido nítrico sintase induzida
i.p. - via intraperitoneal
i.pl. - via intrapleural
LA - *lactic acid*
LES - lúpus eritematoso sistêmico
Linfócito T $\gamma\delta$ - linfócito T gama/delta

LPS - lipopolissacarídeos

LTB₄ - leucotrieno B₄

MCP-1 - proteína quimiotática de monócito-1

MeOD - metanol-d-(4)

Mg²⁺ - íon magnésio

MgCl₂ - cloreto de magnésio

mGR - receptor de glicocorticoide de membrana

MPO - mieloperoxidase

mRNA - *messenger ribonucleic acid*

N - número

NaCl - solução salina estéril

NADPH - Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido

NaOH - hidróxido de sódio

NF-κB - fator nuclear kappa B

NIK - kinase indutora do NF-κB

NK - células *natural killer*

NMR - *nuclear magnetic resonance*

nNOS/NOS1 - óxido nítrico sintase neuronal

NO - óxido nítrico

NO_x - nitrito/nitrato

NO₂⁻ - nitrito

NO₃⁻ - nitrato

NOS - óxido nítrico sintase

O₂⁻ - ânion superóxido

OMS - Organização Mundial da Saúde

Pb - pares de bases

PBS - solução salina tamponada

PCR - reação em cadeia da polimerase
PGD₂ - prostaglandina D₂
PGE₂ - prostaglandina E₂
PGF_{2α} - prostaglandina F₂ alpha
PGG₂ - prostaglandina G₂
PGH₂ - prostaglandina H₂
PGI₂ - prostaglandina I₂
pH - potencial hidrogeniônico
PLA₂ - fosfolipase A₂
RANK - receptor ativador do fator nuclear kappa B
RMN ¹³C - ressonância magnética nuclear de carbonos
RMN ¹H - ressonância magnética nuclear de prótons
RNA - ácido ribonucleico
RNAm - ácido ribonucleico mensageiro
RNase - enzima ribonuclease
RT-PCR - reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
AS - *succinic acid*
SCF - fator de célula tronco
SOD - superóxido dismutase
TcR - receptor de células T
Temp. - temperatura
Th - linfócito T auxiliar
TLR - receptor *toll-like*
TMS - tetametilsilano
TNF-α - fator de necrose tumoral-alpha
TNF-R1 - receptor de TNF-α

TPA - 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

Treg - linfócito T regulador

TXA₂ - tromboxano A₂

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

VCAM-1 - molécula de adesão vascular-1

VCL₃ - cloreto de vanádio III

ZnSO₄ - sulfato de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 PLANTAS MEDICINAIS	31
1.1.1 Gênero <i>Jungia</i>	32
1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO	34
1.3 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS	45
1.4 MODELOS DE INFLAMAÇÃO	48
2 OBJETIVOS	51
2.1 OBJETIVO GERAL	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3 METODOLOGIA	53
3.1 ESTUDO FITOQUÍMICO	53
3.1.1 Coleta e identificação do material vegetal	53
3.1.2 Obtenção e fracionamento do extrato bruto obtido das folhas de <i>Jungia sellowii</i> Less.	53
3.1.3 Isolamento dos constituintes químicos de <i>Jungia sellowii</i> Less.	54
3.1.4 Caracterização dos compostos isolados de <i>Jungia sellowii</i> Less.	55
3.2 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	56
3.2.1 Delineamento do estudo	56
3.2.2 Animais	57
3.2.3 Procedimento anestésico	57
3.2.4 Eutanásia dos animais	57
3.3 PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS	58
3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	58
3.5 TÉCNICAS UTILIZADAS	60
3.5.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos	60
3.5.2 Determinação da exsudação	61
3.5.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase	61
3.5.4 Determinação da atividade da adenosina desaminase	62
3.5.5 Quantificação dos metabólitos do óxido nítrico	62
3.5.6 Determinação das concentrações de IL-1β, TNF-α e IL-17A	63
3.5.7 Semi-quantificação da transcrição de RNAm para IL-1β, TNF-α, IL -17A e iNOS	64
3.5.7.1 Extração e quantificação do RNA do tecido pulmonar de camundongos	64

3.5.7.2 Reação de transcrição reversa (RT).....	65
3.5.7.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	65
3.5.8 Quantificação da fosforilação da proteína p65 (p-p65-NF-κB)	64
3.6 FÁRMACOS E REAGENTES	67
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
4 RESULTADOS	71
4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA	71
4.2 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO.....	73
4.3 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE.....	80
4.4 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE	81
4.5 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NITRITO/NITRATO).....	82
4.6 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE IL-1β, TNF-α e IL-17A.....	83
4.7 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE A TRANSCRIÇÃO DO RNAm PARA IL-1β, TNF-α, IL-17A E iNOS.....	87
4.8 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Jungia sellowii</i> Less. SOBRE A FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA p65 (p-p65-NF-κB).	92
5 DISCUSSÃO	93
6 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	101
ANEXO A - RESUMOS APRESENTADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS	117
ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO: “JUNGIA SELLOWII LESS. SUPPRESSES THE CARRAGENAN-INDUCED INFLAMMATORY RESPONSE IN THE MOUSE MODEL OF PLEURISY”, AO PERIÓDICO PLANTA MEDICA	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas para fins medicinais é uma prática muito antiga e ainda muito comum nos dias de hoje (NEWMAN; CRAGG, 2012). Os produtos naturais são fontes essenciais de novos fármacos, principalmente devido à variedade de metabólitos secundários presentes nas plantas (NGO; OKOGUN; FOLK, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 65% a 80% da população nos países em desenvolvimento utiliza principalmente as plantas para os cuidados primários de saúde (WHO, 2008).

Aproximadamente 25% dos medicamentos são derivados de plantas e muitos outros são análogos sintéticos de compostos isolados de plantas (KALA; DHYANI; SAJWAN, 2006). No século passado, diversas classes de produtos naturais foram isoladas e tiveram suas estruturas químicas caracterizadas, promovendo um avanço significativo para a ciência (MISHRA; TIWARI, 2011).

As propriedades medicinais das plantas contribuem de sobremaneira para o crescimento e a evolução da fitoterapia. Na Índia, por exemplo, de 17.000 espécies de planta, 7.500 são conhecidas pelo seu uso medicinal (KALA; DHYANI; SAJWAN, 2006). Estas descobertas, juntamente com a elucidação da diversidade biológica e do mecanismo de ação farmacológico/bioquímico, são fundamentais para o desenvolvimento da química orgânica e medicinal (LEE, 2010).

O conhecimento de que os produtos naturais são uma fonte para novos tratamentos, tem levado a produção de vários medicamentos utilizados no mundo. Portanto, em vista da crescente necessidade de novos agentes anti-inflamatórios eficazes, os produtos naturais têm sido bastante estudados nos últimos anos (GOSSLAU et al., 2011).

Com o desenvolvimento de novos métodos químicos é possível identificar e caracterizar os nutrientes e os compostos bioativos como, por exemplo, os polifenóis em plantas que têm sido utilizadas para fins terapêuticos ao longo dos anos (GOSSLAU et al., 2011). Como exemplo, podemos citar os

polifenóis e os flavonoides presentes na planta *Jungia paniculata*, que é utilizada na medicina popular como anti-inflamatório.

1.1.1 Gênero *Jungia*

O gênero *Jungia* pertence à família Asteraceae, que compreende arbustos, cipós e ervas, e está presente nas Américas do Norte, Central e do Sul, incluindo o sul do Brasil, onde a espécie *Jungia sellowii* Less. (Figura 1) pode ser encontrada no estado de Santa Catarina (MERCHANT et al., 2002; KATINAS et al., 2008). Esta espécie é popularmente conhecida como Jasmim do banhado (MONGE, 2010).

Na medicina popular, as folhas, caules e flores de *Jungia paniculata* são utilizados para desinfetar ferimentos, tratar inflamações no trato urinário, tonsilite, úlceras estomacais, nefrite, hemorroidas e como antibiótico (HAMMOND et al., 1998; DE-LA-CRUZ; VILCAPOMA; ZEVALLOS, 2007; REHECHO et al., 2011). Além disto, as folhas e os caules de *Jungia polita* são utilizados na medicina popular como depurativo do sangue (GOLENIOWSKI et al., 2006).

CASADO e colaboradores (2010) demonstraram o efeito anti-inflamatório e antioxidante de *Jungia paniculata* e estes resultados foram correlacionados com a presença de polifenóis e flavonoides.

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

Estudos fitoquímicos, realizados por nosso grupo, demonstraram a presença de dois ácidos carboxílicos, o ácido succínico (AS) e o ácido láctico (AL), na fração aquosa, obtida a partir do extrato das folhas de *Jungia sellowii* Less. Esta classe química, mais especificamente os ácidos graxos, tem recebido maior atenção nos últimos anos devido a sua atividade anti-

inflamatória (FARAG; PARÉ, 2013). O ácido láctico, por exemplo, é capaz de inibir a resposta inflamatória ao diminuir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e a ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) (LIU et al., 2011a; JIANG et al., 2013; XU et al., 2013). No entanto, poucos estudos têm sido direcionados em relação aos efeitos biológicos de *Jungia sellowii* Less., mais especificamente à sua atividade anti-inflamatória. Desta forma, este trabalho se propôs a avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados desta espécie, bem como elucidar quais estruturas químicas são responsáveis por este efeito e indicar um possível mecanismo farmacológico para esta atividade. Estas informações talvez possam ser de interesse da indústria farmacêutica para a produção de novos fármacos com atividade anti-inflamatória.

Neste contexto, é importante que alguns mediadores e células envolvidos na resposta inflamatória sejam descritos.

Figura 1 - Imagem de *Jungia sellowii* Less.



Fonte: <https://sites.google.com/site/florasbs/asteraceae/jasmim-do-banhado>. Acesso em: 12 nov 2013

1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório é uma resposta biológica que envolve o recrutamento celular para o local da lesão, a liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios e a ativação de processos de reparação tecidual (GLASS; SAIJO, 2010). Neste evento, observa-se inicialmente uma resposta de fase aguda, que possui duração variável, na qual há uma vasodilatação local e um aumento da permeabilidade microvascular, seguido pela adesão e infiltração de leucócitos e de células fagocíticas no local da lesão. Ainda ocorre, em nível local, apoptose celular e crescimento de novos tecidos e vasos ou fibrose (MEDZHITOV, 2008; MEDZHITOV; HORNG, 2009). A complexidade desta resposta depende de mecanismos que atuam em diferentes etapas, tais como a ativação das células do sistema imune, a regulação das vias de sinalização e o controle da expressão gênica (MEDZHITOV; HORNG, 2009).

Neste processo os eventos podem ser desencadeados por diferentes estímulos, 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 doenças (LENTZ; FEEZOR, 2003). A inflamação aguda é uma resposta rápida a agentes infecciosos ou injúrias e envolve o recrutamento e a ativação de neutrófilos para tentar erradicar o estímulo (POBER; SESSA, 2007).

A complexidade deste processo depende de vários mecanismos que atuam em diferentes etapas, incluindo alterações na resposta celular aos estímulos inflamatórios, a regulação das vias de sinalização e o controle da expressão gênica (MEDZHITOV; HORNG, 2009).

Como mecanismo de reparo, o processo inflamatório consiste em uma cascata de eventos celulares e microvasculares, que tem como objetivo remover o tecido lesado. A cascata inclui: aumento da permeabilidade nos microvasos, agregação das células circulantes dos vasos nas proximidades do local lesado, migração celular, apoptose celular, liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios, crescimento de novos vasos sanguíneos e reparo tecidual (TEDER et al., 2002; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

A resposta inflamatória está relacionada com doenças de caráter agudo e/ou crônico, incluindo doenças metabólicas como o diabetes, doenças autoimunes e doenças de origem neurogênica e degenerativa (MEDZHITOV; HORNG, 2009).

Várias células e mediadores participam da resposta inflamatória. Entre as células, destacam-se os neutrófilos, os linfócitos e os macrófagos. A ativação de fagócitos como os neutrófilos, macrófagos e monócitos é crucial para a eliminação efetiva de patógenos e células mortas (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

Os neutrófilos desempenham um papel importante na inflamação aguda. A liberação destas células na corrente sanguínea é controlada pelo fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), que é produzido em resposta a interleucina-17A (IL-17A) sintetizada por células T que regulam neutrófilos ($\gamma\delta$ e células T *natural killer* (NK)) (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Após serem produzidos na medula óssea, os neutrófilos circulam pelo sangue durante algumas horas (aproximadamente 6-8 horas em humanos e 11 horas em camundongos) (BORREGAARD, 2010; SADIK; KIM; LUSTER, 2011).

Os neutrófilos são células do sistema imune inato e desempenham uma função protetora devido à sua capacidade de fagocitar e produzir importantes substâncias antimicrobianas, enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (NAUSEEF, 2007; MEDZHITOV, 2008; WITKO-SARSAT et al., 2011) e são recrutadas logo no início da resposta inflamatória (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

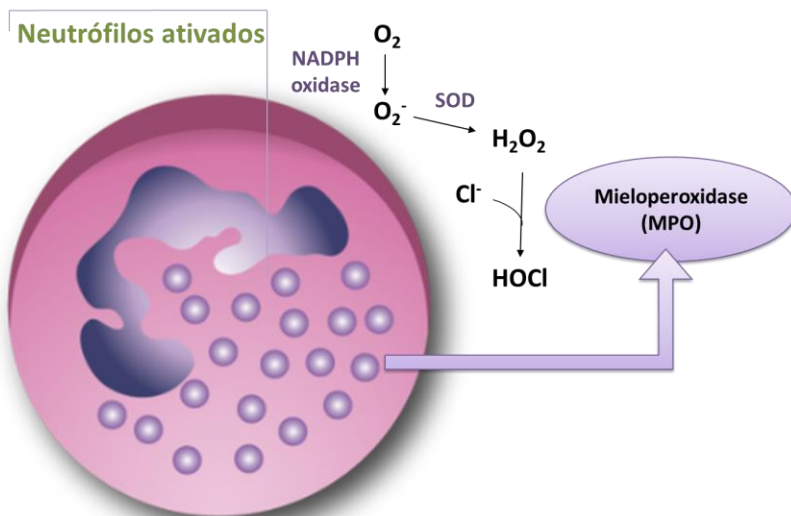
Três tipos de grânulos são formados durante a maturação de neutrófilos, e neles estão contidas proteínas pró-inflamatórias. Os grânulos azurófilos (primários), contém a mieloperoxidase (MPO), os grânulos específicos (secundários), contém a lactoferrina e os grânulos de gelatinase (terciários), contém a metaloproteinase de matriz 9 (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

A MPO é descrita como uma proteína com propriedades pró-inflamatórias expressa principalmente em neutrófilos e, em menor quantidade, em mononucleares (monócitos/macrófagos) (HAEGENS et al., 2009; VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009). A ação desta enzima está associada à atividade fagocítica dos neutrófilos, que envolve a absorção de

organismos patogênicos e a desgranulação, o que resulta na liberação de moléculas antimicrobianas e a morte do agente agressor (PAPAYANNOPOULOS; ZYCHLINSKY, 2009). Durante o processo de fagocitose, no fagossoma dos neutrófilos, ocorre a ativação da enzima adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) que, juntamente com o influxo de íons, favorecem a ativação da MPO (VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009; ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). A presença de oxigênio e do NADPH oxidase resulta na produção do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual é dismutado pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), resultando em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009; ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). Ainda, a MPO é liberada no fagossoma e cataliza a oxidação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de íons cloreto (Cl^-), formando ácido hipocloroso (HOCl) que possui atividades oxidantes e microbicidas (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010; PROKOPOWICZ et al., 2012). No entanto, a ativação contínua do sistema MPO- H_2O_2 -HOCl pode promover uma lesão tecidual, isto porque o HOCl é capaz de iniciar reações de oxidação em lipídeos, no ácido desoxirribonucleico (DNA) e em lipoproteínas (MALLE et al., 2007) (Figura 2).

A MPO é considerada um marcador de leucócitos ativados (LAU; BALDUS, 2006) e pode ser utilizada como marcador de neutrofilia em condições de inflamação e sepse (FAITH et al., 2008). Em algumas doenças autoimunes de caráter inflamatório como a artrite reumatoide, a asma e o lúpus eritematoso sistêmico (LES) observa-se aumento da atividade de MPO (EKMEKCI et al., 2004; VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009; TELLES et al., 2010).

Figura 2 - Mecanismo de ação da mieloperoxidase (MPO) no processo inflamatório.



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. SOD = superóxido dismutase. Fonte: Adaptado de Prokopowicz et al., 2012.

Outras células importantes do sistema imune são os monócitos, os quais estão envolvidos no processo inflamatório tardio e desempenham importante função na imunidade inata e adaptativa (AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009). A infiltração de monócitos é observada principalmente na inflamação crônica, podendo persistir por um longo período de tempo (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006; DALE; BOXER; LILES, 2008). Os monócitos são capazes de se diferenciarem em macrófagos após sua migração para os tecidos. Estas células têm como funções principais a apresentação de antígenos e a fagocitose (AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009). Além disso, os macrófagos ativados podem secretar citocinas como a interleucina-1 (IL-1), IL-6, TNF- α e interferon alfa ou beta (INF- α/β), além de ativar a óxido nítrico sintase (NOS) liberando o óxido nítrico (NO) no endotélio (DALE; BOXER; LILES, 2008). Deste modo, em doenças inflamatórias crônicas, tais como

aterosclerose e retinopatias crônicas, ocorre aumento na quantidade e ativação de monócitos/macrófagos (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006).

Os linfócitos ativados liberam a adenosina desaminase (ADA) que é outra enzima envolvida na resposta inflamatória. A ADA participa do metabolismo das purinas e catalisa irreversivelmente a deaminação da desoxiadenosina e adenosina em desoxinosina e inosina, respectivamente (YEGUTKIN, 2008). A adenosina é um nucleosídeo endógeno presente tanto intra quanto extracelularmente. Em condições fisiológicas, a concentração deste nucleosídeo é baixa, mas pode aumentar rapidamente em resposta a agressões como a hipóxia, isquemia, inflamação ou trauma (ANTONIOLI et al., 2013). A ADA também desempenha função importante na maturação e na ativação de monócitos e linfócitos, podendo ser utilizada como marcador da atividade de células mononucleares (FRÖDE; MEDEIROS, 2001; HASKÓ et al., 2007).

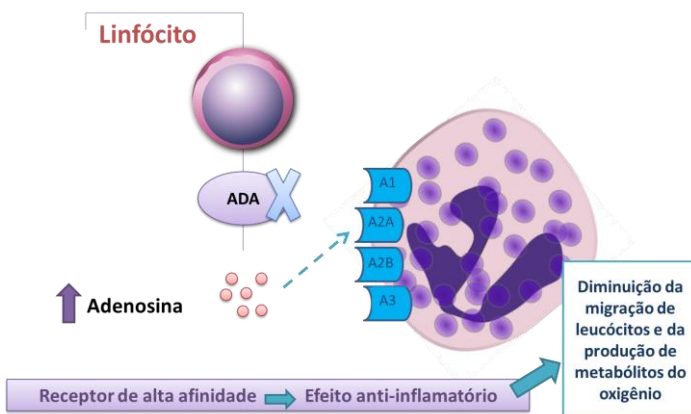
A via de sinalização da adenosina é mediada por receptores de superfície celular que podem ser divididos em quatro subtipos: A1, A2A, A2B e A3 e a afinidade da adenosina ao receptor é dependente da densidade do receptor no tecido (ANTONIOLI et al., 2013). Estes receptores de adenosina são expressos em células, tais como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos T e B, macrófagos, células dendríticas, células do epitélio brônquico, fibroblastos e células endoteliais (FREDHOLM et al., 2001; BROWN; SHORT, 2008).

No processo inflamatório das vias aéreas a atividade da ADA aumenta para promover a catabolização da adenosina. Desta forma, a inibição da atividade da ADA promove um aumento na biodisponibilidade da adenosina, que nestas condições interage com o receptor A2A promovendo um efeito anti-inflamatório. Este efeito anti-inflamatório está relacionado à diminuição da migração de leucócitos e da produção de metabólitos do oxigênio (LAPA et al., 2012) (Figura 3).

Além disso, estudos demonstraram que a ADA desempenha importante função em muitas doenças inflamatórias, pois sua atividade e/ou concentração encontram-se elevadas em pacientes com artrite reumatoide, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doenças intestinais inflamatórias e aterosclerose (CAVALCANTE et al., 2006; SUN et al., 2006; CHAVAN; PATIL; KARNIK, 2007; BROWN; SPINA;

PAGE, 2008; ZAMANI; JAMALI; JAMALI, 2012). Estes estudos demonstraram que a adenosina desaminase é um importante marcador da severidade da resposta inflamatória.

Figura 3 – Mecanismo de ação da adenosina desaminase (ADA) no processo inflamatório.



No processo inflamatório a atividade da ADA aumenta para promover a catabolização da adenosina. Desta forma, a inibição da atividade da ADA promove um aumento na biodisponibilidade da adenosina, que nestas condições interage com o receptor A2A promovendo um efeito anti-inflamatório. Fonte: Adaptado de ANTONIOLLI et al., 2013 e LAPA et al., 2012.

Além das células (neutrófilos e mononucleares) e enzimas (MPO e ADA) que participam da resposta inflamatória, outros importantes mediadores também são liberados na inflamação. Entre os principais mediadores pró-inflamatórios pode-se destacar o NO, que é um gás, liberado principalmente por células endoteliais e por macrófagos. Este mensageiro intracelular é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela enzima NOS (TRIPATHI; TRIPATHI; SINGH, 2007). A NOS apresenta três isoformas: duas formas constitutivas, neuronal (nNOS, NOS1) e endotelial (eNOS, NOS3) e, uma forma induzida, conhecida como iNOS ou NOS2, que é regulada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, entre outros (STEWART; KATIAL, 2012). A iNOS pode ser induzida pelo TNF- α , interferon- γ (IFN- γ),

interleucina-1 β (IL-1 β), vírus, bactérias, alérgenos, poluentes ambientais, entre outros mediadores (STEWART; KATIAL, 2012).

O NO apresenta uma variedade de funções como defesa imune contra organismos infectantes, neurotransmissão, inflamação aguda e crônica, regulação da pressão arterial e a inibição da agregação plaquetária. Além disto, este mediador também regula a função de crescimento e morte celular, induz a apoptose, modula a expressão de moléculas de adesão e regula a síntese de citocinas liberadas pelos leucócitos (TRIPATHI; TRIPATHI; SINGH, 2007).

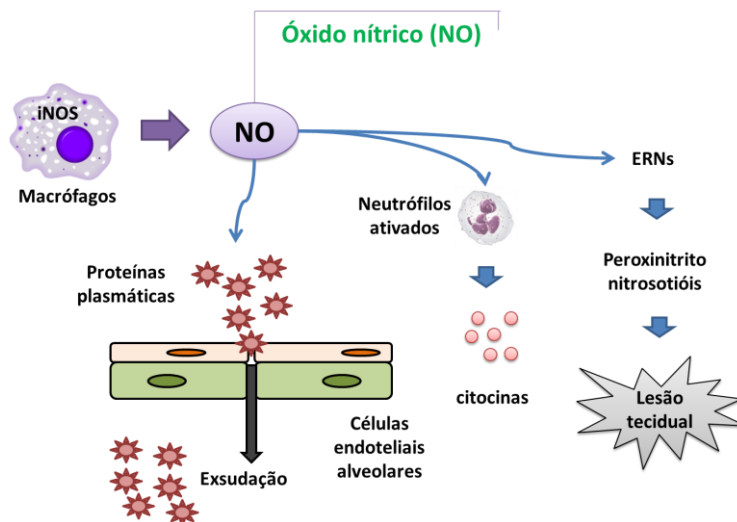
O potencial citotóxico do NO está relacionado à formação de peroxinitrito e os nitrosotióis (TRIPATHI; TRIPATHI; SINGH, 2007). Estes metabólitos são capazes de lesar o DNA, os lipídeos microbianos e as células vizinhas saudáveis, sendo esse o evento observado em doenças autoimunes (RICCIARDOLO et al., 2003; MENEGAZZI et al., 2006).

Em doenças inflamatórias pulmonares tais como, asma brônquica e DPOC, há um aumento nas concentrações de NO (SUGIURA; ICHINOSE, 2011; STEWART; KATIAL, 2012). O NO, derivado da iNOS, induz a liberação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como o peroxinitrito e desempenha assim um papel central na inflamação das vias aéreas e do parênquima pulmonar (SUGIURA; ICHINOSE, 2011; STEWART; KATIAL, 2012) (Figura 4).

Assim como o NO, várias citocinas também participam da resposta inflamatória (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). As citocinas são moléculas solúveis de baixo peso molecular, liberadas principalmente por células ativadas com a finalidade de mediar informações, bem como modular a função celular por meio da ativação de receptores de superfície (STEINKE; BORISH, 2006).

Estes mediadores são produzidos e liberados por diferentes células, incluindo linfócitos T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2) e T helper 17 (Th17), células T reguladoras (Treg), células T citotóxicas, linfócitos B, neutrófilos, mastócitos, macrófagos, células dendríticas, entre outras (STEINKE; BORISH, 2006). Entre as citocinas pró-inflamatórias, destacam-se a IL-1 β , o TNF- α e a IL-17A.

Figura 4 - Proposta de mecanismo de ação do óxido nítrico (NO) sintetizado por macrófagos via óxido nítrico sintase induzida (iNOS) no processo inflamatório.



O NO atua no processo de exsudação, regula a liberação de citocinas por neutrófilos ativados e, em excesso, induz a liberação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como peroxinitrito e nitrosotóico. Fonte: Adaptado de Cuzzocrea et al., 1998 e Kviety; Granger, 2012.

Os efeitos biológicos das citocinas dependem da citocina liberada e do tipo de célula envolvida. De um modo geral, as citocinas promovem a ativação, a divisão, a apoptose e a quimiotaxia celular. Estas substâncias podem também participar da diferenciação celular, na inflamação, na imunidade e no reparo tecidual (BUDHU; WANG, 2006).

A IL-1 β é uma citocina liberada por queratinócitos, fibroblastos, células sinoviais e endoteliais, neutrófilos, macrófagos, mastócitos, células de Schwann, micróglia, astrócitos, entre outros (REN; TORRES, 2009). A concentração desta citocina está aumentada em doenças como a artrite reumatoide, a glomerulonefrite, o enfisema, a doença inflamatória intestinal, a sepse e a asma (OLIVEIRA et al., 2008; GOLEVA et al., 2008). Pode-se observar como resposta sistêmica a esta citocina febre, mialgias, dor nas articulações, fadiga, dor de

cabeça, náuseas, desconforto gastrointestinal, hipotensão, neutrofilia e trombocitose (KASZA, 2013).

O TNF- α é outra citocina pró-inflamatória liberada por neutrófilos, macrófagos, células T e B, células NK, mastócitos, células endoteliais, células musculares cardíacas e lisas, fibroblastos, osteoclastos, células do estroma, entre outros (BRADLEY, 2008; CANTAERT et al., 2010). Este é um mediador importante na resposta inflamatória, pois induz sua própria secreção e estimula a produção de outras citocinas como a IL-1 β (BRADLEY, 2008; CANTAERT et al., 2010; CHU, 2013). O TNF- α também é capaz de promover a ativação do NF- κ B, que por sua vez, pode ativar cascatas de sinalização que promovem diferentes respostas biológicas, tais como apoptose, diferenciação, proliferação e ativação da migração celular (BRADLEY, 2008; NAUDÉ et al., 2011; WAJANT; SCHEURICH, 2011).

Uma das principais funções biológicas do TNF- α é a defesa contra infecções bacterianas e virais (CHU, 2013). Entretanto, a concentração desta citocina está elevada em doenças inflamatórias, tais como artrite reumatoide, espondiloartropatias, psoríase, doença intestinal inflamatória e asma (MOUSA; GONCHARUK; MILER, 2007; BRADLEY, 2008; GOLEVA et al., 2008; CANTAERT et al., 2010).

As células T helper (Th) tem um papel importante na modulação da resposta imune, sendo que as células Th1 e Th2 regulam a imunidade humoral e as Th17 regulam a inflamação e a destruição tecidual por meio da liberação da IL-17 (CROME; WANG; LEVINGS, 2009).

Várias citocinas podem ativar a resposta Th17 como, por exemplo, a IL-1 β , IL-6 e/ou a interleucina-23 (IL-23) (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; CHEN et al., 2007; EVANS et al., 2007; WILSON; BONIFACE; CHAN, 2007; LIU; ROHOWSKY-KOCHAN, 2008).

As células Th17 liberam a IL-17, interleucina-17F (IL-17F), e interleucina-22 (IL-22), o que induz uma resposta inflamatória importante no tecido lesado. Estes mediadores têm sido associados com a patogênese de várias doenças autoimunes de caráter inflamatório (KORN et al., 2009).

A família da IL-17 é composta por seis membros, IL-17A a IL-17F, que apresentam resíduos de cisteínas carboxi-terminal. A IL-17A é também referida apenas como IL-17, uma vez que esta

citocina foi a primeira desta família a ser descrita na literatura (MIOSSEC; KOLLS, 2012). Deste modo, a IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que contribui na patogênese de várias doenças inflamatórias, autoimunes e câncer (CUA; TATO, 2010; MIOSSEC; KOLLS, 2012). Esta citocina é liberada por células da resposta imune inata (neutrófilos, células epiteliais e NK) e adaptativa (linfócitos CD8+, T γ δ , principalmente CD4+(T_H17)) (BENGHIAT et al., 2009; CUA; TATO, 2010; MIOSSEC; KOLLS, 2012). A IL-17 contribui tanto para a resposta inflamatória aguda quanto crônica, uma vez que promove o recrutamento de neutrófilos e de monócitos para o local da inflamação. Isto ocorre porque esta citocina induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, TNF- α , IL-1 β , além de fatores de crescimento hematopoiético como o G-CSF, fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), além de quimiocinas (interleucina-8 (IL-8), quimiocina ligante cisteína-X-cisteína-1 (CXCL1), quimiocina ligante cisteína-X-cisteína-2 (CXCL2), quimiocina ligante cisteína-X-cisteína-5 (CXCL5), quimiocina ligante cisteína-X-cisteína-7 (CXCL7) e proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) (BENGHIAT et al., 2009; NEMBRINI; MARSLAND; KOPF, 2009; MIOSSEC; KOLLS, 2012).

Entre as diversas funções biológicas da IL-17A, a mais estudada está relacionada com seu efeito pró-inflamatório (CROME; WANG; LEVINGS, 2009). A IL-17A é capaz de ativar o NF- κ B, promovendo a liberação de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (SONG; QIAN, 2013) e também medeia a infiltração de neutrófilos (NEWCOMB; PEEBLES Jr, 2013).

A liberação de IL-17 tem sido relatada em diversas doenças, incluindo, psoríase, espondilite anquilosante, doença de Crohn, colite ulcerativa, esclerose múltipla, artrite reumatoide, asma, do DPOC, entre outras (WANG; LIU, 2008; BENGHIAT et al., 2009; CUA; TATO, 2010; MIOSSEC; KOLLS, 2012).

O NF- κ B foi descoberto como um fator de transcrição envolvido na regulação de cadeia leve de imunoglobulina kappa em células B e hoje compõe uma família de fatores de transcrição composta por NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB e c-Rel (DIAMANT; DIKSTEIN, 2013), que podem ser ativados por citocinas como a IL-1 β e o TNF- α , vírus e estresse oxidativo (LEE; YANG, 2013).

O NF- κ B é conhecido como um fator regulador da resposta inflamatória. Quando ele é ativado, ocorre a indução da expressão de genes que regulam diversos processos biológicos, como a inflamação, a resposta ao estresse, a proliferação e a diferenciação celular, a apoptose e o reparo tecidual (LEE; YANG, 2013). Esta ativação é normalmente um processo transitório, no entanto, em certas doenças inflamatórias ou no câncer esta ativação é persistente (DIAMANT; DIKSTEIN, 2013).

A atividade dos diferentes dímeros de NF- κ B é regulada por sua interação com proteínas inibitórias (p105, p100, e I kappa B-alpha, beta, gama (I κ B- α , β , γ), que mantém estes complexos no citoplasma em sua forma inativa. Quando a célula recebe um sinal para ativação do NF- κ B, a interação entre o I κ B e o NF- κ B é interrompida permitindo que o NF- κ B migre para o núcleo para ativar diferentes genes. A maioria destes sinais de ativação converge para a ativação de um complexo de alto peso molecular, que contém uma I κ B kinase (IKK) que estimula o NF- κ B em duas diferentes vias de sinalização, a canônica e a não canônica (DIAMANT; DIKSTEIN, 2013).

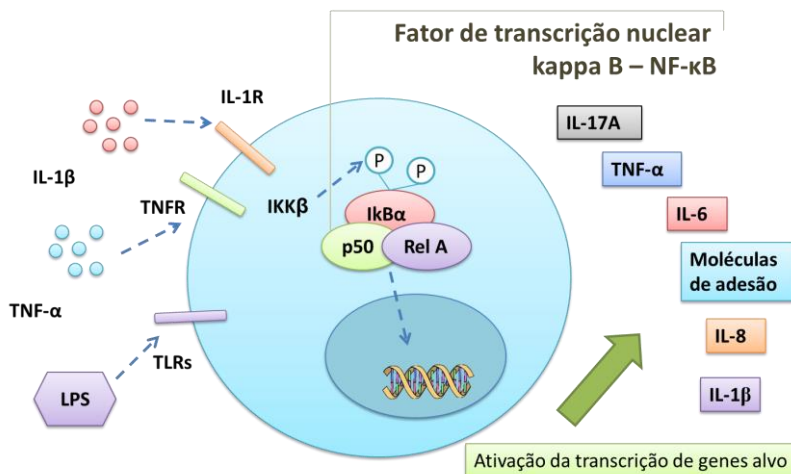
Na ativação do NF- κ B pela via canônica, os sinais são mediados por receptores *toll-like* (TLRs), receptor para IL-1 (IL-1R), receptor para TNF (TNFR) e receptores para antígenos. Entre as moléculas que estimulam esta via podemos citar a IL-1 β , o TNF- α e o lipopolissacarídeo (LPS). Em sequência a interação das moléculas com seus respectivos receptores, ocorre a ativação do complexo I κ B kinase (IKK), que fosforila a I κ B α (HOESEL; SCHMID, 2013).

Outra via alternativa para a ativação do NF- κ B é a via não canônica. Nesta via os sinais são mediados por diferentes receptores, que incluem o fator de ativação de células B (BAFFR), CD 40, receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), entre outros. Na sequência, ocorre a ativação da kinase indutora do NF- κ B (NIK), que fosforila e ativa a IKK1. Esta ativação induz a fosforilação do p100, resultando na ubiquitinação e degradação parcial do p52 (HOESEL; SCHMID, 2013).

A inflamação está associada com a ativação da via de sinalização canônica do NF- κ B. Desta forma, ocorre à produção e a liberação de citocinas que regulam a resposta imune como, por exemplo, o TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8, bem como moléculas de

adesão, que promovem o recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação (HOESEL; SCHMID, 2013) (Figura 5).

Figura 5 – Esquema de ativação da via canônica do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B).



Citocinas pró inflamatórias como a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o lipopolissacarídeo (LPS) ao interagirem com seus respectivos receptores ativam a enzima I kappa B kinase β (IKK β) que fosforila a proteína inibitória I κ B α , permitindo a translocação do homo ou heterodímero do NF- κ B para o núcleo da célula, onde ocorre a ativação da transcrição de genes alvo. IL-1R = receptor de IL-1 β , TNFR = receptor de TNF- α , TLR = receptor *toll-like*, IL-17A = interleucina 17A, IL-6 = interleucina 6, IL-8 = interleucina 8. Fonte: Adaptado de HOESEL; SCHMID, 2013.

1.3 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS

Entre os medicamentos anti-inflamatórios clássicos, utilizados nestes experimentos, destaca-se a indometacina (Indo), um inibidor seletivo da enzima ciclooxigenase (COX), que pertence à classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007).

Os medicamentos dessa classe são usualmente utilizados por possuírem eficácia no tratamento contra a dor, a febre e o edema, que são consequências da liberação de mediadores pró-

inflamatórios (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007). Entre estes mediadores destacam-se as citocinas, o leucotrieno B₄ (LTB₄), a prostaglandina E₂ (PGE₂), a prostaglandina I₂ (PGI₂), as espécies reativas de oxigênio, entre outros (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007; RAO; KNAUS, 2008). Os AINEs exercem seu efeito anti-inflamatório agindo na via do ácido araquidônico inibindo a COX e, desta forma, impedem a síntese de eicosanoides e de prostanóide (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007; RAO; KNAUS, 2008). O efeito dos AINEs na produção de prostaglandinas é também a principal causa da sua toxicidade, promovendo a disfunção renal, risco de doenças cardiovasculares e problemas gastrointestinais (LAINE et al., 2006; MCGETTIGAN; HENRY, 2011). A figura 6 ilustra a via do ácido araquidônico, bem como o mecanismo de ação anti-inflamatório dos AINEs.

Neste estudo, também foi utilizada a dexametasona (Dexa) como fármaco anti-inflamatório de referência para representar a classe dos glicocorticoides. Estes medicamentos atuam em vários eventos da cascata inflamatória (FLAMMER; ROGATSKY, 2011).

Os glicocorticoides possuem um papel importante na regulação do metabolismo, pressão arterial e no sistema imune (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).

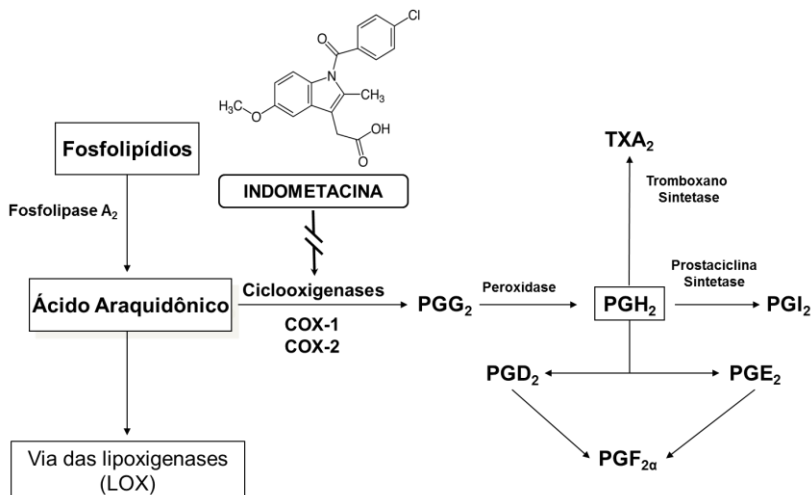
Os efeitos não-genômicos podem ser classificados em 4 mecanismos: 1) sinalização por meio de um receptor de membrana citoplasmática; 2) efeito direto na membrana citoplasmática; 3) interação entre o receptor de glicocorticoide e outras proteínas sinalizadoras no citoplasma celular; 4) translocação do receptor de glicocorticoide para a mitocôndria (BOLDIZSAR et al., 2010).

Já o seu efeito genômico ocorre por meio da ligação entre o glicocorticoide e um receptor específico presente na membrana citoplasmática, seguida da translocação do complexo glicocorticoide-receptor para o núcleo, 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 (GM-CSF, fator de célula tronco (SCF)), moléculas de adesão (ICAM-1 e molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1)), NO, autacoides, entre outros (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; BARNES, 2010). A transativação gênica promove a transcrição de genes de citocinas anti-inflamatórias, que incluem a IL-10 e a IL-12, além do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), da anexina 1, da proteína I κ B- α , entre outras (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; BARNES, 2010).

Na figura 7, está ilustrado o mecanismo de ação anti-inflamatório dos glicocorticoides.

Figura 6 - Via do ácido araquidônico e mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs).



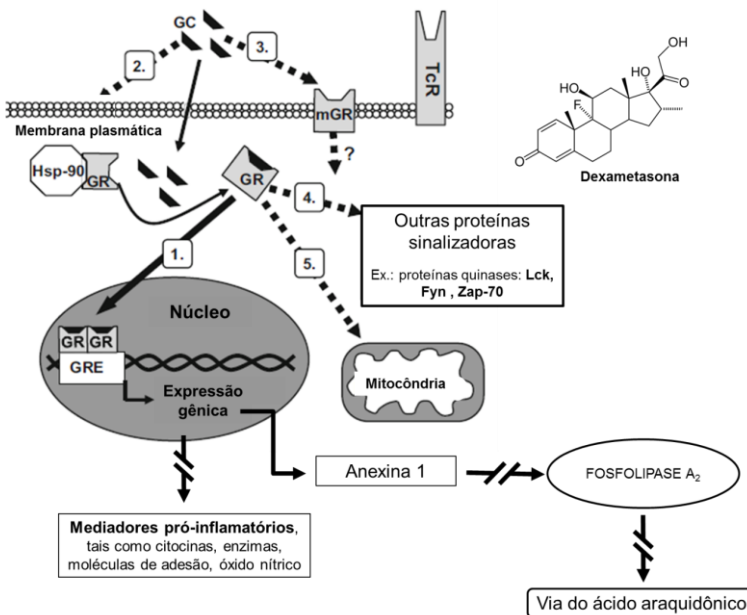
Os AINEs atuam inibindo a enzima ciclooxigenase (COX) que catalisa a síntese de prostaglandinas. PGG₂ = prostaglandina G₂, PGH₂ = prostaglandina H₂, PGI₂ = prostaglandina I₂ ou prostaciclina, PGD₂ = prostaglandina D₂, PGE₂ = prostaglandina E₂, PGF_{2α} = prostaglandina F₂ alfa, TXA₂ = tromboxano A₂.

Seta contínua (→) = conversão;

seta interrompida (→) = inibição.

Fonte: Adaptado de DANNHARDT; KIEFER, 2001.

Figura 7 - 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, GRE = elementos responsivos aos glicocorticoides, TcR = receptor de células T.

Seta contínua (—————>) = vias de sinalização genômica;

setas tracejadas (- - - - ->) = vias de sinalização não-genômica;

seta interrompida (- / - / ->) = inibição.

Fonte: Adaptado de BOLDIZSAR et al., 2010.

1.4 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).

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 (LEWKOWICH; WILLS-KARP, 2008).

Entre os modelos utilizados para a indução de inflamação pulmonar, destacam-se a indução de infecção pulmonar com *Pseudomonas aeruginosa* e o uso de LPS para a estimulação da resposta imune inata (HOFFMANN et al., 2005; DONG et al., 2009).

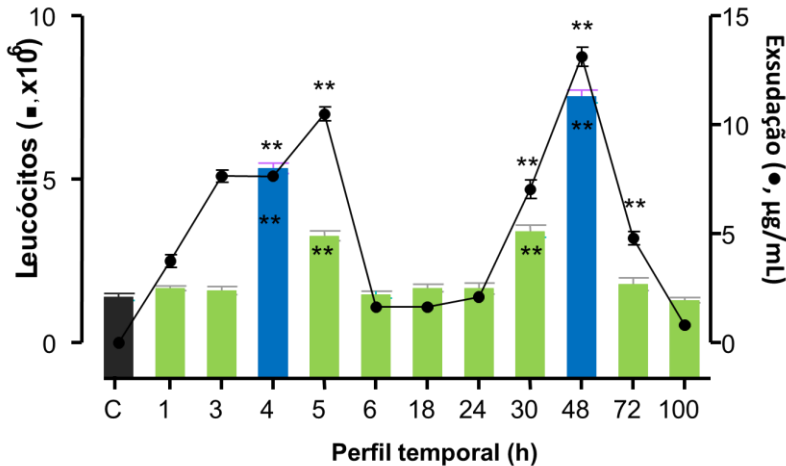
A pleurisia é um modelo que mimetiza a inflamação neutrofílica na cavidade pleural e no pulmão e foi originalmente desenvolvido em ratos (SPECTOR, 1956) e mais tarde reproduzido em cobaias (LEWKOWICH; WILLS-KARP, 2008) e camundongos (HENRIQUES et al., 1990).

A carragenina (Cg) é uma substância muito utilizada para a indução da inflamação em estudos experimentais, ela é composta por uma mistura de polissacarídeos derivados principalmente das algas *Chondrus crispus*, cujo nome popular é musgo-irlandês (BRITO, 1989). De acordo com Tsuji e colaboradores (2003), a Cg promove sua ação pró-inflamatória por ativar receptores celulares do tipo *toll-like* 4 (TLR4) em macrófagos e linfócitos.

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 (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996) (Figura 8). O modelo da pleurisia induzida pela Cg em camundongos mimetiza a resposta inflamatória do tipo bifásica que ocorre na asma em humanos. Este modelo possui vantagens em relação aos outros citados, pois possibilita o estudo sobre a liberação de mediadores, enzimas e influxo celular no lavado pleural de animais como camundongos ou ratos (HENRIQUES et al., 1990; SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

Este modelo é considerado bom para a avaliação do efeito anti-inflamatório de extratos de plantas. Desta forma, o presente trabalho optou pelo modelo experimental da pleurisia induzida por Cg, utilizando-se apenas da primeira fase (4 h) da resposta inflamatória. Outra razão para esta escolha foi que a técnica já é padronizada em nosso laboratório.

Figura 8 - 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.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados obtidos de *Jungia sellowii* Less., administrados sistemicamente, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar, caracterizar e quantificar por meio de metodologias analíticas os compostos isolados a partir do extrato bruto e frações de *Jungia sellowii* Less.
- b) Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto de *Jungia sellowii* Less., frações e compostos isolados sobre a migração dos leucócitos e a exsudação.
- c) Investigar o efeito do extrato bruto de *Jungia sellowii* Less., frações e compostos isolados sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) e da adenosina desaminase (ADA).
- d) Investigar o efeito do extrato bruto de *Jungia sellowii* Less., frações e compostos isolados sobre as concentrações de nitrito/nitrato (NO_x), interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-17A (IL-17A).
- e) Investigar se o material vegetal é capaz de inibir/aumentar a expressão do RNAm para IL-1 β , TNF- α , IL-17A e óxido nítrico sintase induzida (iNOS).
- f) Investigar se os compostos isolados de *Jungia sellowii* Less. poderiam interferir na fosforilação da proteína p65 do NF- κ B.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAL VEGETAL

3.1.1 Coleta do material vegetal

As folhas de *Jungia sellowii* Less. foram coletadas (em apenas uma coleta) no município de Rio Negrinho, Santa Catarina, Brasil, durante o mês de março de 2012. A identificação botânica da planta foi realizada pelo botânico Dr. Ademir Reis do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Uma exsicata da espécie encontra-se no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brasil, sob o número RB 537.991.

3.1.2 Obtenção e fracionamento do extrato bruto obtido das folhas de *Jungia sellowii* Less.

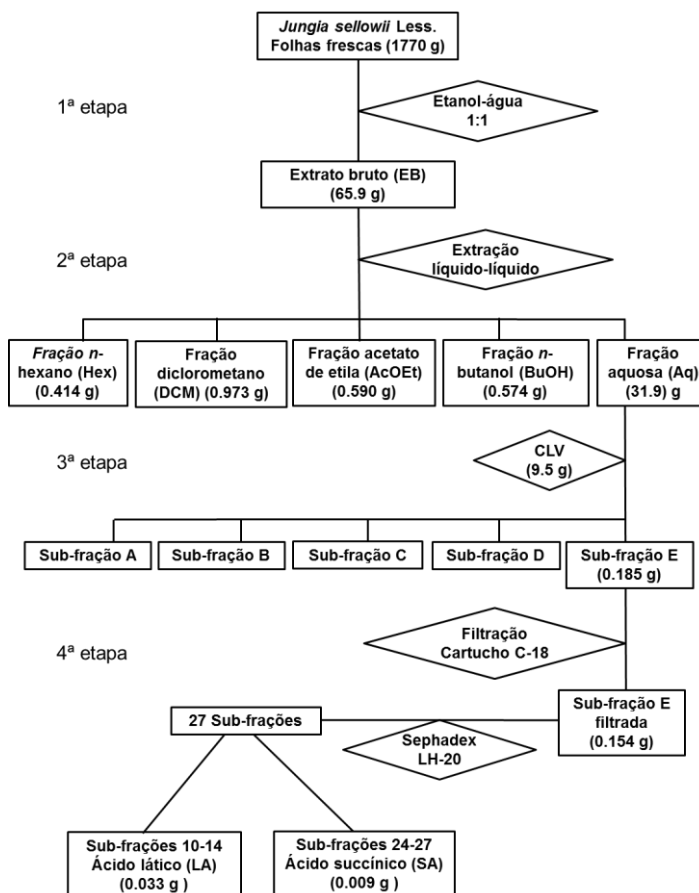
As folhas frescas de *Jungia sellowii* Less. (1770 g) foram submetidas à extração, até exaustão do material vegetal, por processo de maceração à temperatura ambiente por 30 dias, utilizando-se etanol 96% e água como líquidos extratores (3 L, etanol/água 50:50, v/v). Em seguida, o extrato foi filtrado e concentrado com auxílio de um evaporador rotativo (Rotavapor® R-210, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suíça), resultando em 65,9 g do extrato hidroalcoólico bruto (EB). O EB foi submetido ao processo de fracionamento em funil de separação utilizando-se solventes de ordem crescente de polaridade. Para tal, inicialmente suspendeu-se o EB (65,9 g) em 500 mL de água. O extrato suspenso (solução aquosa) foi submetido a uma partição líquido/líquido, com *n*-hexano (300 mL), diclorometano (400 mL), acetato de etila (400 mL) e *n*-butanol (500 mL). Após a evaporação dos solventes em evaporador rotativo; obtiveram-se as frações *n*-hexano (Hex: 0,414 g), diclorometano (DCM: 0,973 g), acetato de etila (AcOEt: 0,590 g) e *n*-butanol (BuOH: 0,574 g), bem como a fração residual aquosa (Aq), a qual foi liofilizada, gerando um sólido higroscópico (Aq: 31,9 g) (Figura 9). Estes

procedimentos foram realizados pelas alunas Alyne Machado Barbosa e Tamires Cardoso Lima no laboratório de Farmacognosia da Prof. Dra. Maique Weber Biavatti (CIF – UFSC).

3.1.3 Isolamento dos constituintes químicos de *Jungia sellowii* Less.

Uma alíquota da fração residual aquosa (9,5 g) foi submetida à cromatografia líquida a vácuo (CLV), empregando sílica RP-18 (230-400 mesh) (Tedia Brasil, RJ, Brasil) como fase estacionária e, água e metanol como fase móvel. A eluição da coluna foi realizada utilizando diferentes gradientes de água e metanol (100:0, 70:30, 50:50, 30:70, 0:100), gerando cinco subfrações (A, B, C, D e E). A subfração E (0,185 g) foi dissolvida em metanol (20 mL) e filtrada utilizando-se um cartucho C-18 (Tedia Brasil, RJ, Brasil) para a retenção dos compostos não polares. Em seguida, essa subfração filtrada (0,154 g) foi purificada por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (Tedia Brasil, RJ, Brasil), utilizando uma mistura de acetona:metanol (1:1) como fase móvel. Ao final deste procedimento, foram coletadas 27 frações. As frações 10-14 (0,033 g) e 24-27 (0,009 g), após análise por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), foram reunidas, obtendo-se o AL e o AS, respectivamente (Figuras 9 e 10).

Figura 9 - Diagrama da sequência de obtenção do extrato bruto, frações, e compostos isolados das folhas de *Junglia sellowii* Less.



CLV = Cromatografia líquida a vácuo. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

3.1.4 Caracterização dos compostos isolados de *Junglia sellowii* Less.

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em espectrofotômetro modelo Bruker AVANCE DRX (Bruker, Fremont, CA, EUA), sendo utilizado 400 MHz para a frequência do ^1H e 100 MHz para a frequência do ^{13}C . O óxido de deutério

(D₂O) foi empregado como solvente e, o tetrametilsilano (TMS), como referência interna. Os compostos isolados apresentaram grau de pureza espectral superior a 99%.

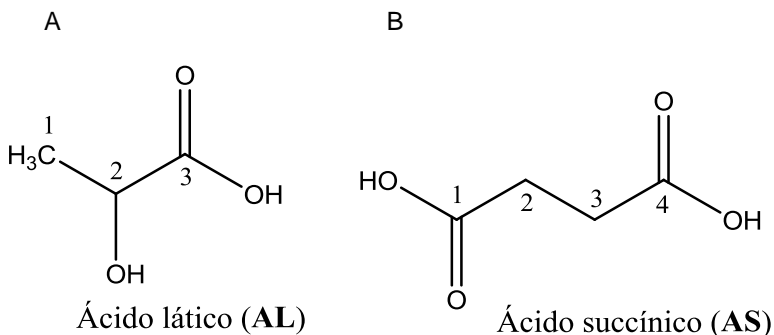
Ácido láctico (AL)

Líquido incolor. RMN de ¹H: δ 1,26 (d, J=7 Hz, H-1), 4,22 (q, J = 7 Hz, H-2). RMN de ¹³C: δ 21,9 (C-1), 69,6 (C-2), 182,4 (C-3).

Ácido succínico (AS)

Sólido branco. RMN de ¹H: δ 2,66 (s, H-2 e H-3). RMN de ¹³C: δ 34,4 (C-2 e C-3), 181,2 (C-1 e C-4).

Figura 10 - Estruturas químicas dos compostos isolados a partir da fração aquosa das folhas de *Jungia sellowii* Less.



Ácido láctico (AL) (A) e ácido succínico (AS) (B). Fonte: Desenvolvido pelo autor.

3.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

3.2.1 Delineamento do estudo

Estudo experimental, prospectivo e controlado.

3.2.2 Animais

Camundongos albinos Swiss fêmeas (n = 600), pesando entre 18 e 21 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 Cg (1%, i.pl.), grupo 3 animais que receberam uma injeção intraperitoneal de Dexa (Dexa: 0,5 mg/kg, ip), grupo 4 animais que receberam Indo (Indo: 5 mg/kg, ip), grupos de 5 a 12 animais que receberam uma injeção intraperitoneal de diferentes doses de EB, frações ou compostos isolados de *Jungia sellowii* Less. Os animais mencionados receberam alimentação e água *ad libitum* durante todos os dias, inclusive nos dias de experimentação, estes 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).

3.2.3 Procedimento anestésico

Neste protocolo experimental, a anestesia foi induzida com a administração de pentobarbital (60 mg/kg, i.p) para a administração da solução de azul de Evans (25 mg/kg) pela veia gengival (OLIVEIRA; SOUZA-SILVA; TONUSSI, 2009).

3.2.4 Eutanásia dos animais

Os animais foram submetidos à eutanásia com *overdose* de pentobarbital (180 mg/kg).

3.3 PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

A pleurisia foi induzida por uma única injeção intrapleural de 0,1 mL de Cg a 1% (diluída em solução fisiológica estéril, 0,95% de NaCl). Após 4 h, os animais foram submetidos à eutanásia com overdose de pentobarbital (180 mg/kg) administrada por via i.p. 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, concentração de exsudação, atividades das enzimas MPO e ADA, além da quantificação dos metabólitos do NO e de citocinas (IL-1 β , TNF- α e IL-17A). As amostras de tecido pulmonar foram coletadas para a análise da expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para IL-1 β , TNF- α , IL-17A, e iNOS e para a avaliação da fosforilação da proteína p65 (p-p65 de NF- κ B).

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 da atividade das enzimas MPO e ADA, bem como da concentração de nitrito/nitrato (NO_x) e das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-17A, análise da expressão do RNAm para IL-1 β , TNF- α , IL-17A, e iNOS e para a avaliação da fosforilação da proteína p65 (p-p65 de NF- κ B), os animais não receberam a injeção com azul de Evans, uma vez que este corante pode interferir nas dosagens colorimétricas e enzimáticas empregadas para a quantificação dos parâmetros inflamatórios.

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para determinar as doses de material vegetal a serem utilizadas nos experimentos, foram realizadas curvas dose-resposta para o EB, frações e compostos isolados de *Jungia*

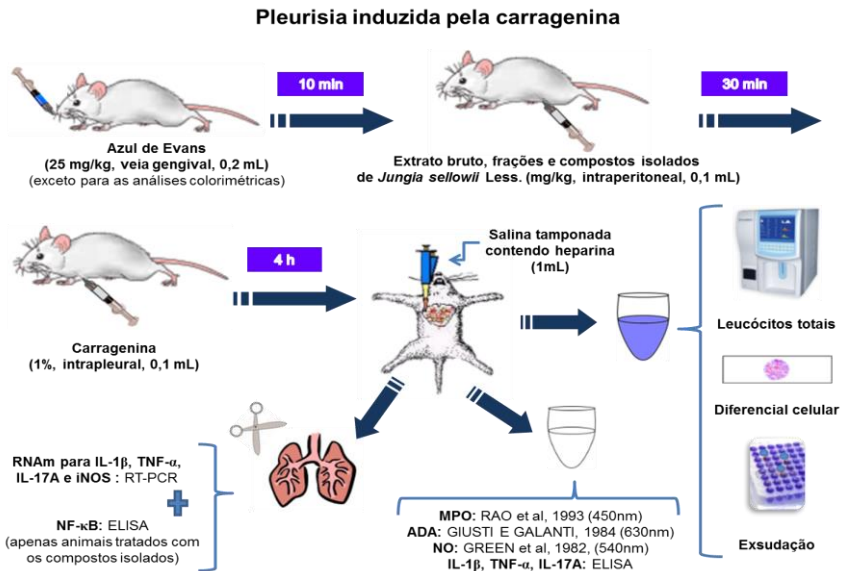
sellowii Less. Sendo assim, diferentes grupos de animais foram tratados com diferentes doses de EB (10-50 mg/kg), Hex (25-50 mg/kg), DCM (25-50 mg/kg), AcOEt (25-50 mg/kg), BuOH (10-50 mg/kg), Aq (1-25 mg/kg), AS (0,5-2,5 mg/kg) ou AL (0,5-2,5 mg/kg) administrados por via intraperitoneal, 0,5 h antes da indução da pleurisia com Cg (1%), administrada por via i.pl. A quantificação de leucócitos total e diferencial e as concentrações de exsudação foram analisadas após 4 h. Em relação aos solventes utilizados, o EB, frações e compostos isolados foram solubilizados em uma mistura de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) em solução salina (NaCl a 0,95%) (Figura 11).

Em outro conjunto de experimentos, para avaliar o perfil temporal, diferentes grupos de animais receberam uma dose única de EB (25 mg/kg), BuOH (25 mg/kg), Aq (5 mg/kg), AS (1 mg/kg) ou AL (1 mg/kg), ou seja a melhor dose (menor dose capaz de inibir o influxo de leucócitos e a concentração de exsudação) 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.

Com base nestes resultados, as menores doses do material vegetal que foram capazes de inibir significativamente o influxo de leucócitos e as concentrações de exsudação, administrados 0,5 h antes da aplicação da Cg, foram seleccionadas para cada grupo (EB: 25 mg/kg, BuOH: 25 mg/kg, Aq: 5 mg/kg, AS: 1 mg/kg e AL: 1 mg/kg) para avaliar o efeito do EB, suas frações derivas e compostos isolados sobre a atividade das enzimas MPO e ADA e as concentrações de NO_x, IL-1 β , TNF- α e IL-17A, a expressão do RNAm para IL-1 β , TNF- α , IL-17A e iNOS e a avaliação da fosforilação da proteína p65 (p-p65-NF- κ B). Todos os parâmetros foram analisados após 4 h de indução da pleurisia.

A Dexametasona (Dexa) (0,5 mg/kg) e a Indometacina (Indo) (5 mg/kg), administradas por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da pleurisia, foram utilizadas como fármacos de referência de ação anti-inflamatória.

Figura 11 – Modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.



Parâmetros inflamatórios estudados. ADA = adenosina desaminase, ELISA = *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, IL-1 β = interleucina 1 β , IL-17A = interleucina 17A, iNOS = óxido nítrico sintase induzida, MPO = mieloperoxidase, NF- κ B = fator nuclear-kappa B, NO = óxido nítrico, RNAm = ácido ribonucleico mensageiro RT-PCR = reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa, TNF- α = fator de necrose tumoral- α .
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

3.5 TÉCNICAS UTILIZADAS

3.5.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos

Após a eutanásia dos animais, alíquotas de 15 μ L do lavado da cavidade pleural foram coletadas para a contagem total dos leucócitos, utilizando-se o contador celular automatizado veterinário com seus parâmetros ajustados 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 dos lavados 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 1000 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 da exsudação

A exsudação foi determinada pela avaliação indireta das concentrações do corante azul de Evans no exsudato pleural (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Assim, em cada grupo experimental, os animais foram tratados 10 minutos antes da Cg com solução de corante azul de Evans (25 mg/kg), administrados na veia gengival, a fim de quantificar a exsudação.

No dia dos experimentos, alíquotas (200 μL) do lavado da cavidade pleural foram coletadas e mensuradas por meio da densidade ótica em leitora de microplacas de enzima-imunoensaio (ELISA) (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA), em 620 nm (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Para a quantificação das concentrações 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, e formulou-se uma equação da reta que permitiu a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.5.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase

As amostras do lavado pleural foram coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais, para a quantificação da atividade da enzima MPO, de acordo com a metodologia descrita por RAO e colaboradores (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 microplacas e a reação enzimática foi iniciada com a adição de 180 μL de solução de 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 ELISA (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.

3.5.4 Determinação da atividade da adenosina desaminase

As amostras do lavado da cavidade pleural (10 μL), contendo a enzima ADA, foram transferidas para tubos de ensaio e a reação enzimática foi iniciada 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 um período de incubação de 1 h a 37 °C, em estufa, 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, 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) foi utilizada neste protocolo. A avaliação da atividade da ADA, no lavado pleural, foi realizada pela geração de amônia ocasionada pela quebra da adenosina que foi adicionada ao meio. A amônia gerada reage com o fenol e o hipoclorito, a reação é dependente de pH alcalino e é 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 ELISA (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA) em 620 nm (GIUSTI; GALANTI, 1984). Os valores da atividade de ADA foram expressos em U/L.

3.5.5 Quantificação dos metabólitos do óxido nítrico

O NO foi indiretamente quantificado, no lavado pleural, pela formação de seus metabólitos nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), utilizando-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982). Para esta

análise, no dia dos experimentos, alíquotas de 300 μL de cada amostra do lavado pleural foram submetidas à desproteinização. Em cada amostra, foram adicionados 30 μL de solução de sulfato de zinco (20%) sob agitação em vórtex e posterior incubação 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 deste sobrenadante de cada amostra foram transferido para um poço de microplaca de ELISA e diluídos em solução contendo 100 μL de solução saturada de cloreto de vanádio (0,8%) (p/v), 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 em estufa (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). Nesta reação o cloreto de vanádio converte o NO_3 em NO_2^- e com a adição do reagente de Griess forma-se uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades óticas em leitor de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA) em 540 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO_2^- (0-150 μM) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato, em μM , com auxílio da equação da reta.

3.5.6 Determinação das concentrações de IL-1 β , TNF- α e IL-17A

Para a análise das concentrações de IL-1 β , TNF- α e IL-17A, imediatamente após a eutanásia dos animais, alíquotas do lavado da cavidade pleural foram coletadas e processadas para a quantificação destas citocinas. Neste protocolo, kits comerciais disponíveis foram utilizados com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina. As concentrações das citocinas foram mensuradas utilizando-se a técnica de ELISA tipo sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante.

As sensibilidades identificadas nos kits foram: IL-1 β : 11,72 – 750 pg/mL, TNF- α : 5 – 2.000 pg/mL e IL-17A: 4 – 500 pg/mL. Os coeficientes de variação (CV) intraensaios foram: IL-1 β : 3,6 \pm 0,5%, TNF- α : 7,8 \pm 0,9% e IL-17A: 7,5 \pm 1,7%. Enquanto os CV interensaios foram: IL-1 β : 9,0 \pm 1,7%, TNF- α : 9,6 \pm 2,1% e IL-17A: 6,2 \pm 0,9%. As curvas-padrão com concentrações

conhecidas de IL-1 β (31,3 – 2.000 pg/mL), TNF- α (5,00 – 2.300,00 pg/mL) e IL-17 (4,00 – 500,00 pg/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo-se a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta. As leituras de todas citocinas e suas respectivas curvas-padrão foram determinadas por meio da medida colorimétrica em 450 nm, realizadas em leitor de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). Os valores foram expressos em pg/mL.

3.5.7 Semi-quantificação da transcrição de RNAm para IL-1 β , TNF- α , IL -17A e iNOS

A expressão do RNAm para IL-1 β , TNF- α , IL -17A e iNOS foi analisada no tecido pulmonar dos camundongos.

3.5.7.1 Extração e quantificação do RNA de tecido pulmonar de camundongos

Primeiramente, para a extração do RNA total, 200 mg de tecido pulmonar foram inseridos em tubos do tipo eppendorf (2 mL) que continham 1 mL de Brazol[®]. Este tecido foi imediatamente picotado com auxílio de aparato cirúrgico livre de ribonucleases (RNAses). O material obtido foi homogenizado em vórtex por cerca de 30 s e incubado a temperatura ambiente (25 °C) por 5 min. Após o período de incubação foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio ao eppendorf, e o material foi novamente homogenizado e incubado por mais 3 min, a temperatura ambiente (25 °C). Após esta etapa, o material foi centrifugado a 12.000 x g (4 °C) por 15 min, e a fase superior (fase aquosa) foi transferida para um outro tubo eppendorf. A este novo tubo adicionou-se 0,5 mL de isopropanol e incubou-se o material por 10 min, a temperatura ambiente (25 °C). Ao final desta etapa, o material foi novamente centrifugado por 10 min a 12.000 x g (4 °C), e o RNA total presente no sedimento foi recuperado (DALMARCO et al., 2012). Deste modo, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol (70%, v/v). A seguir, realizou-se a centrifugação do material a 7.500 x g (4 °C) por 5 min e descartou-se o sobrenadante com posterior secagem do material em estufa (40 °C) por 10 min. Em seguida, foi adicionado ao sedimento 100 μ L de água livre de RNAses

(0,01% dicarbonato de dietila (DEPC), v/v) (DALMARCO et al., 2012). No final do processo de extração, a determinação da concentração e da pureza do RNA total, foram conferidas por leitura espectrofotométrica a 260 nm e pela razão entre as absorvâncias obtidas em 260 nm e 280 nm respectivamente, com auxílio do aparelho picodrop™ (Hinxton, Cambridgeshire, Inglaterra).

3.5.7.2 Reação de transcrição reversa (RT)

Para eliminar a contaminação com DNA genômico, as amostras de RNA total (1 µg/µL) foram tratadas com desoxirribonuclease (DNase I[®]), segundo instruções do fabricante (Fermentas[®], Burlington, Ontario, Canadá). A seguir, 500 ng de cada amostra foram transferidas para microtubos (200 µL) e, adicionou-se 50 µM de oligonucleotídeo (Oligo dT 12-18)[®], 10 mM de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) e 6 µL de água DEPC (0,01%). Estas amostras foram homogenizadas e incubadas por 5 min a 65°C, em termociclador (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e, posteriormente, acondicionados em banho de gelo por 2 min (DALMARCO et al., 2012).

Na próxima etapa, foram adicionados aos microtubos, 4 µL de solução tampão (First Strand Buffer 5x), 1 µL de DL-ditiltreitolo (DTT) (0,1 M), 1 µL de enzima inibidora de RNases (Ribolock[®] 20 U) e 1 µL da enzima Superscript III[®] (200 U), totalizando 20 µL de volume final. Estes microtubos foram agitados em vórtex e incubados por 1 h a 60 °C, em termociclador. Finalizada a incubação, os microtubos que agora continham o DNA complementar (cDNA), foram novamente incubados por 15 min a 70 °C, em termociclador, visando inativar as enzimas adicionadas anteriormente. Após este período, os microtubos foram armazenados em freezer (-80 °C) para posterior análise das amostras, por reações em cadeia da polimerase (PCR) (DALMARCO et al., 2012).

3.5.7.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas utilizando 2 µL de cDNA (obtidos da RT), 1 µM de cada oligonucleotídeo: senso e antisenso correspondentes a cada gene estudado (Tabela 1), 0,2

mM de dNTPs, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 2,5 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e 2,5 mM de tampão (10x PCR Buffer livre de Mg^{++}), obtendo-se um volume final de reação de 25 μL . A reação de PCR ocorreu em quatro etapas: 1) Fase de desnaturação do cDNA, incubando as amostras a 95 °C durante 5 min; 2) Fase de amplificação, 35 a 40 ciclos (45 s a 95 °C, 45 s na temperatura específica de cada oligonucleotídeo e 45 s a 72 °C) (Tabela 1); 3) Fase de extensão, pelo qual a incubação foi de 72 °C por 7 min; 4) incubação a 4 °C por tempo indeterminado. Todas as etapas ocorreram em termociclador (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA). O desenho dos iniciadores específicos para cada gene foi obtido com base nas sequências publicadas no Gene-Bank e nas condições para PCR descritas em nossos protocolos, visando amplificar uma região gênica única (Tabela 1) (DALMARCO et al., 2012).

Iniciadores que amplificam o gene da β -actina de expressão constitutiva foram utilizados como controle positivo de amplificação gênica. Além disso, para excluir a possibilidade de contaminação, foram utilizados controles negativos contendo somente água como amostra.

Terminadas as reações de PCR, 8 μL de cada amostra correspondente aos grupos estudados foram misturados a 2 μL de tampão de corrida (*Gel loading buffer* 6x) e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,0% contendo brometo de etídio (EtBr, 0,5 $\mu g/mL$). A leitura do gel de agarose foi realizada com o auxílio de aparelho transiluminador de luz ultravioleta (Vilber Lourmat[®], Capt Foto-System) (Marne-la-Vallée, Paris, França). A quantidade relativa do produto da reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) para IL-1- β , TNF- α , IL-17A e iNOS foi determinada por fotografia digital e análise da densitometria dos géis de agarose corados com EtBr, normalizados com o controle interno (β -actina), utilizando uma versão de imagem foto-Capt 12.4 para Windows[®].

3.5.8 Quantificação da fosforilação da proteína p65 (p-p65-NF- κ B)

Neste ensaio, o tecido pulmonar dos camundongos foi coletado (20 mg), para a avaliação do efeito dos compostos isolados, AS e AL, sobre a fosforilação da proteína p65 (NF- κ B). O kit comercial de ELISA, Insta ONE phospho-NF- κ B p65

(Ser536) (eBioscience, San Diego, CA, EUA), com anticorpos monoclonais específicos para a proteína p65 de camundongo fosforilada foi utilizado de acordo com o protocolo do fabricante. A absorção das amostras foi obtida em 450 nm, em leitor de placas de ELISA (Organon-Teknika, Roseland, NJ, EUA). Para padronizar a análise da fosforilação da proteína p65 o conteúdo total de proteínas foi mensurado utilizando a metodologia descrita por LOWRY e colaboradores (1951) e o conteúdo foi ajustado a 60 mg de proteína por amostra, em todos os grupos estudados. Os resultados foram expressos em comparação com o grupo controle negativo, que representa uma expressão basal de fosforilação para p-65.

3.6 FÁRMACOS E REAGENTES

Neste estudo, foram utilizados os seguintes reagentes e fármacos: dexametasona (Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil), pentobarbital (Hypnol[®], Cristália, São Paulo, SP, Brasil), carragenina- λ (grau IV), hidróxido de sódio (NaOH), mieloperoxidase de neutrófilos humanos, indometacina, o-dianisidina.2HCl (3,3'dimetoxibenzidina), azida sódica, cloreto de vanádio (III) (VCl₃), sulfanilamida (C₆H₈N₂O₂S), iniciadores para a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30 %) (Biotech, São Paulo, SP, Brasil), adenosina (C₁₀H₁₃N₅O₄) (Fluka, Ronkonkoma, Nova York, EUA), heparina (Liquemine[®], Roche, São Paulo, SP, Brasil), fosfato de sódio (NaH₂PO₄.H₂O), sulfato de zinco (ZnSO₄) (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), fenol (C₆H₅OH), fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado (Na₂HPO₄.12H₂O) (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), nitroprussiato (C₅FeN₅Na₂O.2H₂O) (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil), sulfato de amônio (NH₃SO₄) (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 (C₃₄H₂₄N₆O₁₄S₄Na₄) (Acros-Organics, Geel, Antwerp, Bélgica); Dihidrocloro de N-(1-naftil)-etilenodiamina (C₁₂H₁₆Cl₂N₂) (Merck, Frankfurter, Darmstadt, Alemanha). Neste protocolo foram utilizados ainda, kits de ELISA para a quantificação de IL-1 β , TNF- α , IL-17A e o 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 eBioscience, Inc. (San Diego, CA, USA.), respectivamente. Agarose (Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz, Madri, Espanha), Brazol[®], brometo de etídio (EtBr) (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), Superscript III[®], Oligo-dT (12-18)[®], dNTPs e DNase grade I[®], RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit e Ribolock[®] (Fermentas, Burlington, Canada). Outros sais e reagentes de grau de pureza analítica foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variáveis foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (e.p.m) de cinco animais por grupo e em valores em percentuais. As diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e grupos tratados com o material vegetal ou com os fármacos de referência (Dexa ou Indo) foram determinadas por análise de variância de duas vias (ANOVA), seguida pelo teste pos-hoc de Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Toda a análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism (versão 3.0) (San Diego, Califórnia, EUA).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos (iniciadores) e condições utilizadas nas reações de RT-PCR.

Gene	Iniciadores	Produto de amplificação (pb)	Ciclos de amplificação	Temp. (°C) de desnaturação	Temp. (°C) de hibridização	Temp. (°C) de extensão	Registro no Genbank
β -actina	CCAACCGTGAAGAAGATGACC GCAGTAATCTCCTTCTGCATCC	606	30	95	52	72	BC138614.1
IL-1 β	CAGGCAGGCAGTATCACTCA GGCCACAGGTATTTTGTGG	350	35	95	53	72	BC11437.1
TNF- α	CTGGGACAGTGACCTGGACT CACCTCAGGGAAAGAGTCTG	204	36	95	50	72	BC137720.1
IL-17A	TCTCTGATGCTGTTGCTGCT TCTCTGATGCTGTTGCTGCT GTGGAACGGTTGAGGTAGT	195	38	95	48	72	BC119309.1
iNOS	GCATCCATGCAAGAAGATGTG GCAGCCTCTTGCTTTGACC	282	40	95	51	72	NC000077.5

TNF- α = Fator de necrose tumoral- α , IL-1 β = Interleucina-1 β , IL-17A = Interleucina 17A, iNOS = óxido nítrico sintase induzida, pb = pares de bases, Temp. = Temperatura.

4 RESULTADOS

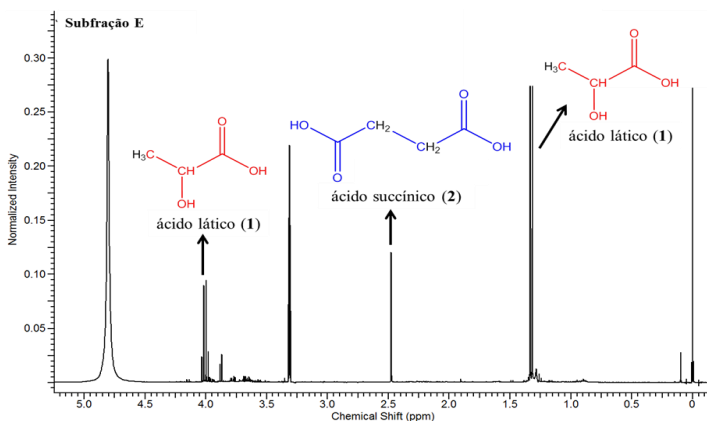
4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

O estudo fitoquímico da subfração E do resíduo aquoso de *Jungia sellowii* Less. revelou a presença de dois ácidos carboxílicos majoritários, o AL e o AS, representando 57,2% e 14,3% dessa subfração, respectivamente. Estes compostos foram identificados por RMN e os valores dos deslocamentos químicos de próton e carbono estão de acordo com os dados da literatura (WILLIAMS; PETTERSON; ROBERTS, 2002; BUZAS et al., 2003; NORD; VAAG; DUUS, 2004).

O espectro de RMN de ^1H do AL mostrou 2 sinais, um duplete em 1,25 ppm, integrando para 3H, atribuído aos hidrogênios do grupo metil e, um quarteto em 4,22 ppm, integrando para 1H, referente ao hidrogênio metino. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou três sinais, em 21,9 (C-1), 69,6 (C-2) e 182,4 (C-3) ppm (Figuras 12 e 13).

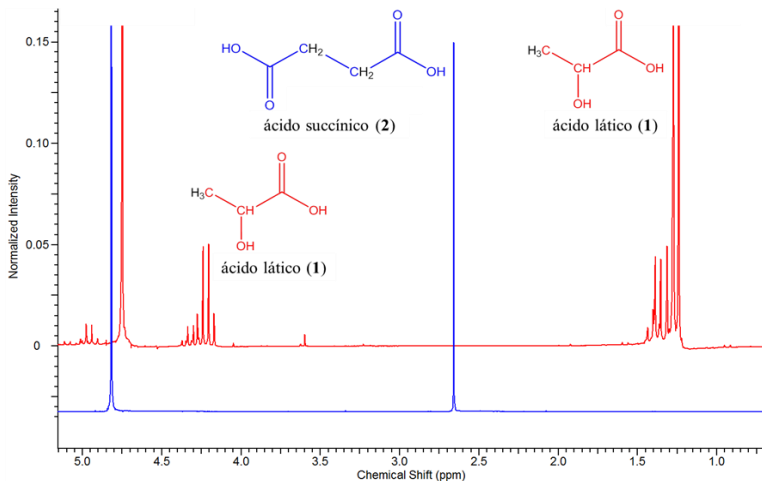
O espectro de RMN de ^1H do AS apresentou apenas um simpleto em 2,47 ppm, integrando para 4H, correspondentes aos dois grupos metileno (os quatro hidrogênios alquilas do AS são equivalentes em simetria). O espectro de RMN de ^{13}C revelou apenas dois sinais de carbono, em 34,4 (C-2 e C-3) e 181,2 (C-1 e C-4) ppm (Figuras 12 e 13).

Figura 12 – Espectro RMN de ^1H da sub-fração E (400 MHz, metanol-d- (4) (MeOD)), mostrando o ácido láctico (1) e o ácido succínico (2).



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 13 – Espectro RMN de ^1H sobreposto dos compostos ácido láctico (1) e o ácido succínico (2) (400 MHz, água deuterada (D_2O)), mostrando os sinais correspondentes a cada hidrogênio.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.2 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Jungia sellowii* Less. SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO

Na inflamação causada pela Cg, o EB (25 e 50 mg/kg) obtido das folhas de *Jungia sellowii* Less. diminuiu significativamente e de maneira dose dependente, a migração de leucócitos, variando de $42.8 \pm 2.9\%$ a $66.8 \pm 5.8\%$, em comparação com o grupo controle positivo ($p < 0,01$) (Figura 14A). Nas mesmas doses estudadas este efeito foi associado com a inibição significativa de neutrófilos variando de $40.3 \pm 3.4\%$ a $65.8 \pm 6.0\%$ ($p < 0,01$) (Figura 14B). No entanto, o mesmo efeito não foi observado em relação às células mononucleares ($p > 0,05$) (Figura 14C). Nas doses de 10 - 50 mg/kg o EB foi capaz de inibir a exsudação variando de $31.2 \pm 3.8\%$ a $51.4 \pm 3.3\%$ ($p < 0,01$) (Figura 14D).

A fração BuOH (25 e 50 mg/kg) apresentou resultados semelhantes aos do EB, inibindo significativamente a migração de leucócitos, variando de $29.8 \pm 4.4\%$ a $42.8 \pm 5.3\%$ ($p < 0,01$) (Figura 15A), e neutrófilos, variando de $28.0 \pm 4.4\%$ a $40.0 \pm 5.9\%$ ($p < 0,01$) (Figura 15B). Na dose de 25 mg/kg esta fração inibiu significativamente a migração de células mononucleares, com um percentual de inibição de $78.2 \pm 4.6\%$ ($p < 0,05$) (Figura 15C). Todas as doses desta fração que foram testadas (10 - 50 mg/kg) foram capazes de reduzir a exsudação, variando de $58.2 \pm 4.0\%$ a $76.5 \pm 3.6\%$ ($p < 0,01$) (Figura 15D).

A fração Aq apresentou efeito anti-inflamatório mais potente do que o EB e a fração BuOH ao inibir a migração de leucócitos e a exsudação em doses menores (1 - 5 mg/kg). A fração Aq, nas doses de 5 - 25 mg/kg inibiu significativamente a migração de leucócitos, variando de $47.4 \pm 5.0\%$ a $60.7 \pm 5.2\%$ ($p < 0,01$) (Figura 16A), e de neutrófilos, variando de $45.9 \pm 5.3\%$ a $59.8 \pm 5.2\%$ ($p < 0,01$) (Figura 16B). Nas doses de 1- 15 mg/kg esta fração demonstrou inibir a migração de células mononucleares, variando de $59.5 \pm 6.9\%$ a $77.2 \pm 5.8\%$ ($p < 0,05$) (Figura 16C). Esta fração também inibiu a exsudação nas doses de 1 - 25 mg/kg, variando de $41.4 \pm 2.7\%$ a $73.4 \pm 3.2\%$ ($p < 0,01$) (Figura 16D). Desta forma, esta fração foi escolhida para o isolamento dos compostos AS e AL.

Os compostos isolados AS e AL, nas doses de 1 e 2,5 mg/kg inibiram significativamente a migração de leucócitos,

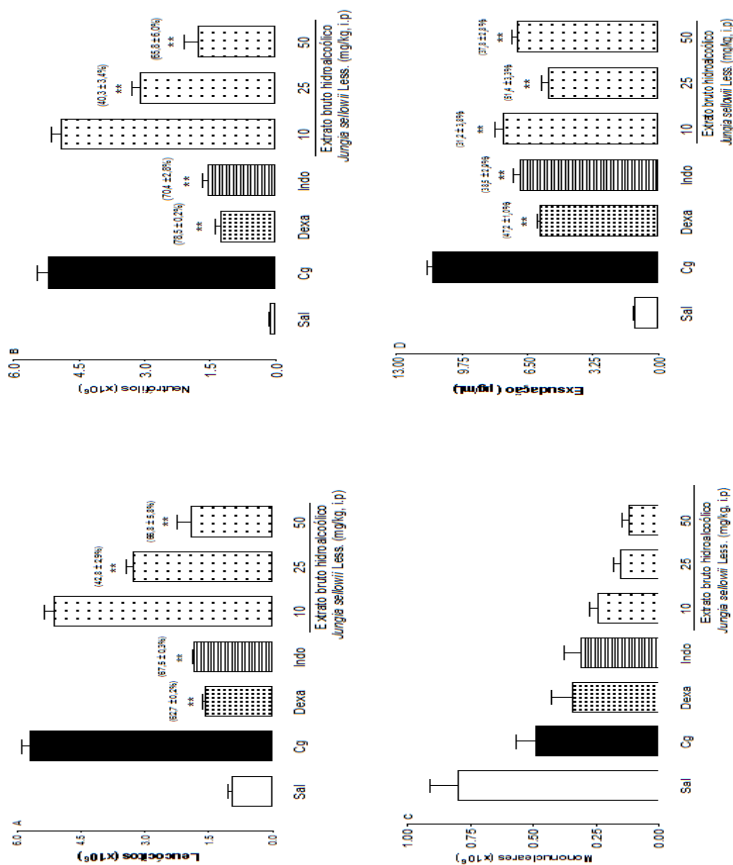
variando de $24.9 \pm 6.8\%$ a $54.4 \pm 2.9\%$ para o AS e de $31.2 \pm 4.3\%$ a $66.3 \pm 5.3\%$ para o AL ($p < 0,01$) (Figura 17A e 18A), e de neutrófilos, variando de $25.6 \pm 6.3\%$ a $53.2 \pm 3.3\%$ para o AS e de $31.8 \pm 4.2\%$ a $66.2 \pm 5.2\%$ para o AL ($p < 0,01$) (Figura 17B e 18B). Na dose de 2,5 mg/kg ambos os compostos inibiram a migração de células mononucleares, com um percentual de inibição de $73.9 \pm 2.7\%$ para o AS e de $74.2 \pm 5.6\%$ para o AL ($p < 0,05$) (Figura 17C e 18C). Ainda, os compostos inibiram a exsudação em todas as doses testadas, 0,5 – 2,5 mg/kg, variando de $15.0 \pm 2.6\%$ a $42.9 \pm 4.8\%$ para o AS e de $23.4 \pm 2.9\%$ a $52.6 \pm 3.4\%$ para o AL ($p < 0,01$) (Figura 17D e 18D).

As frações Hex, DCM e AcOEt inibiram a exsudação, mas não foram capazes de inibir a migração de leucócitos (resultados não mostrados) e por este motivo não foram avaliadas em relação a outros parâmetros inflamatórios.

Os fármacos de referência (Dexa: 0,5 mg/kg e Indo: 5 mg/kg) inibiram significativamente estes parâmetros inflamatórios ($p < 0,01$) (Figuras 14 a 18).

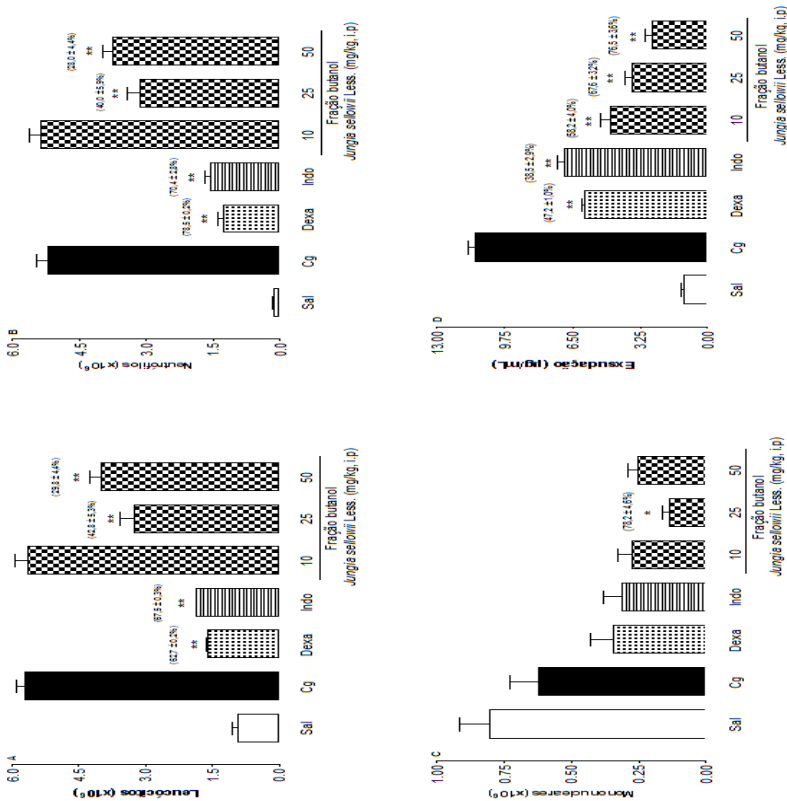
O estudo da curva dose-resposta demonstrou que as melhores doses do EB, frações e compostos isolados que inibiram os parâmetros inflamatórios estudados foram as seguintes: EB: 25 mg/kg, BuOH: 25 mg/kg, Aq: 5 mg/kg, AS: 1 mg/kg e AL: 1 mg/kg. Além disso, o estudo da curva tempo-resposta mostrou que o EB, suas frações derivadas e compostos isolados foram eficazes em inibir os parâmetros inflamatórios (leucócitos e exsudação) quando administrado somente 0,5 h antes da Cg (resultados não apresentados). A partir destes dois estudos, estas doses e o tempo de tratamento prévio foram utilizados para a análise de outros parâmetros inflamatórios.

Figura 14 - Efeito do extrato bruto (EB) (10 - 50 mg/kg) obtido das folhas 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.



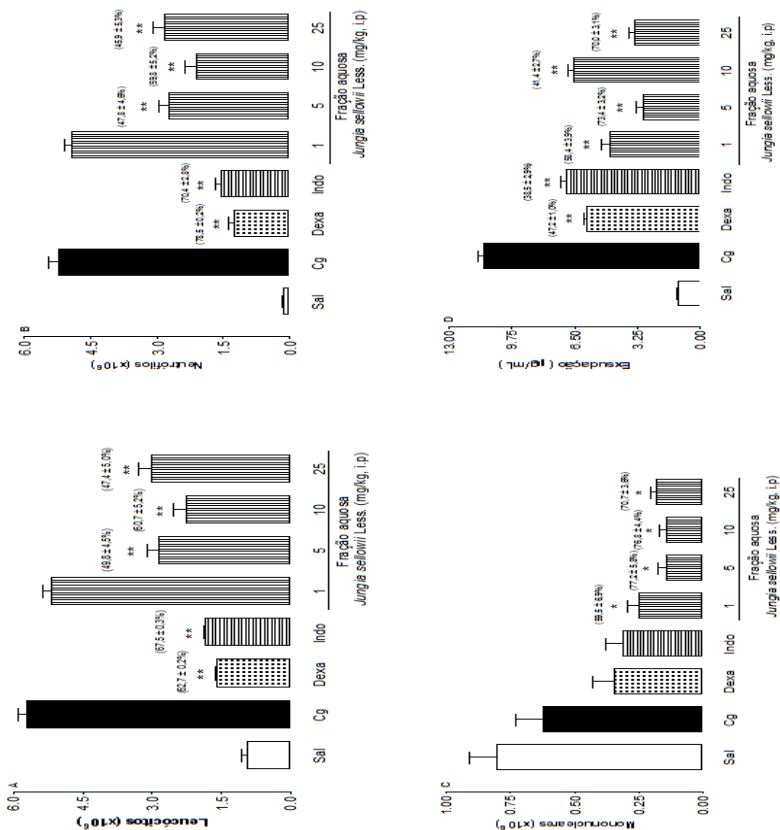
Efeito do EB sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Sal = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** $p < 0,01$. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 15 - Efeito da fração butanol (BuOH) (10 - 50 mg/kg) obtida das folhas 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.



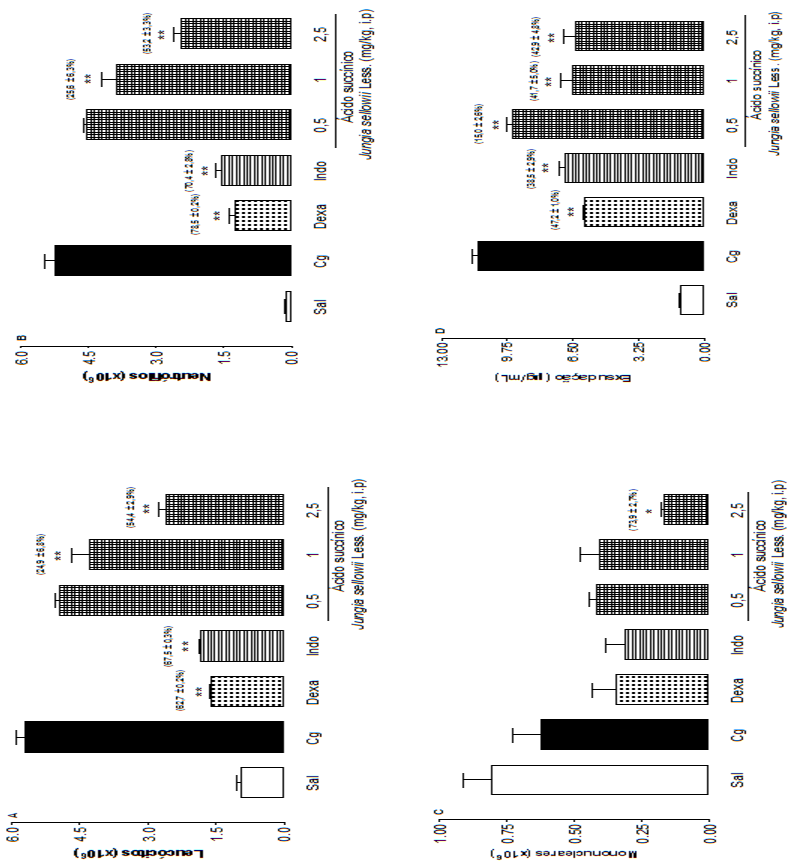
Efeito da fração BuOH sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Sal = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média ± e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. * $p < 0,5$ e ** $p < 0,01$. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 16 - Efeito da fração aquosa (Aq) (1 - 25 mg/kg) obtida das folhas 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.



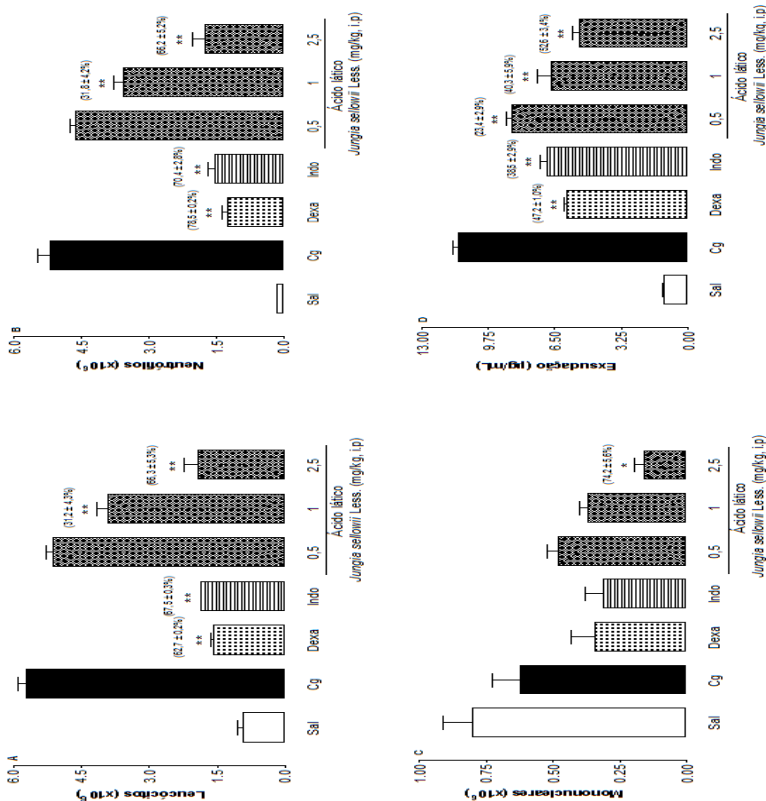
Efeito da fração Aq sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Sal = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. * $p < 0,5$ e ** $p < 0,01$. Desenvolvido pelo autor.

Figura 17 - Efeito do ácido succínico (AS) (0,5 – 2,5 mg/kg) obtido da fração aquosa 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.



Efeito do AS sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Sal = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. * $p < 0,5$ e ** $p < 0,01$. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 18 - Efeito do ácido láctico (AL) (0,5 – 2,5 mg/kg) obtido da fração aquosa de *Jungia sellowii* Less., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleuraral (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.



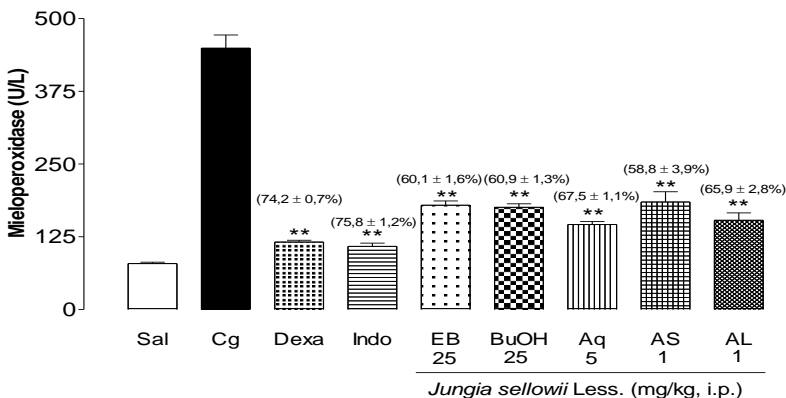
Efeito do AL sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Sal = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados somente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. * $p < 0,5$ e ** $p < 0,01$. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.3 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Jungia sellowii* Less. SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

Quando comparado com o grupo controle positivo o tratamento prévio (0,5 h) dos animais com o EB, frações e compostos isolados de *Jungia sellowii* Less. reduziu de forma significativa a atividade da enzima MPO (% de inibição: EB: $60,1 \pm 1,6\%$, BuOH: $60,9 \pm 1,3\%$, Aq: $67,5 \pm 1,1\%$, AS: $58,8 \pm 3,9\%$ e AL: $65,9 \pm 2,8\%$) ($p < 0,01$) (Figura 19).

A Dexametasona e a Indometacina também reduziram significativamente a atividade da MPO ($p < 0,01$) (Figura 19).

Figura 19 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).



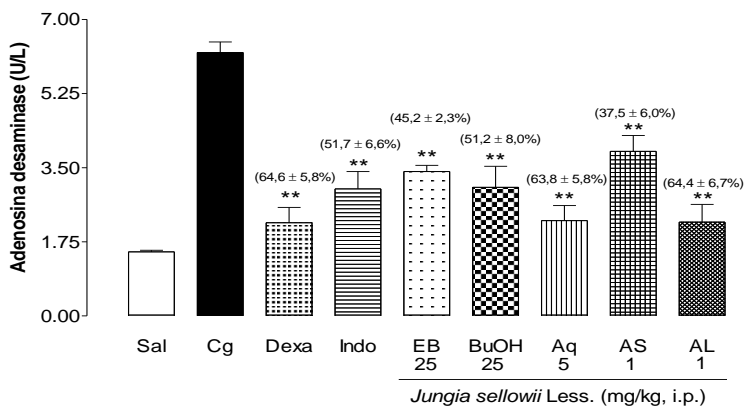
Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** $p < 0,01$. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.4 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Jungia sellowii* Less. SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE

O EB, suas frações derivadas e os compostos isolados também foram capazes de inibir significativamente a atividade da enzima ADA (% de inibição: EB: $45,2 \pm 2,3\%$, BuOH: $51,2 \pm 8,0\%$, Aq: $63,9 \pm 5,8\%$, AS: $37,5 \pm 6,0\%$ e AL: $64,4 \pm 6,7\%$), em comparação com o grupo controle positivo ($p < 0,01$) (Figura 20).

Os fármacos de referência, Dexa e Indo, também reduziram a atividade desta enzima pró-inflamatória ($p < 0,01$) (Figura 20).

Figura 20 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido lático (AL: 1 mg/kg) isolados 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 atividade da enzima adenosina desaminase (ADA).



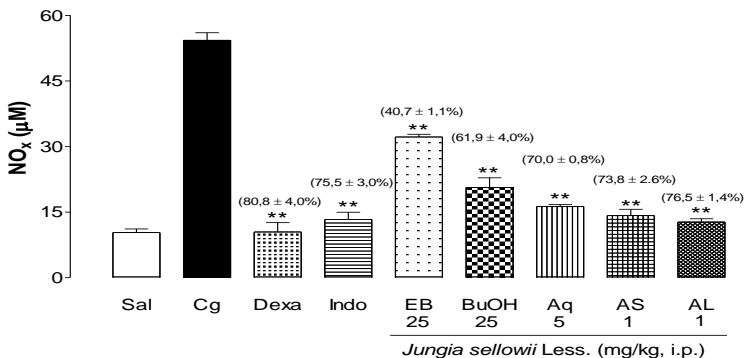
Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** $p < 0,01$. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.5 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 e compostos isolados de *Jungia sellowii* Less. diminuíram significativamente as concentrações de nitrito/nitrato com um percentual de inibição de EB (25 mg/kg): $40,7 \pm 1,1\%$, BuOH (25 mg/kg): $62,0 \pm 4,0\%$, Aq (5 mg/kg): $70,4 \pm 0,8\%$, AS (1 mg/kg): $73,8 \pm 2,6\%$ e AL (1 mg/kg): $76,5 \pm 1,4\%$, em comparação com o grupo controle positivo ($p < 0,01$) (Figura 21).

Os fármacos de referência anti-inflamatória também reduziram as concentrações de nitrito/nitrato ($p < 0,01$) (Figura 21).

Figura 21 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 a concentração de nitrito/nitrato (NO_x).



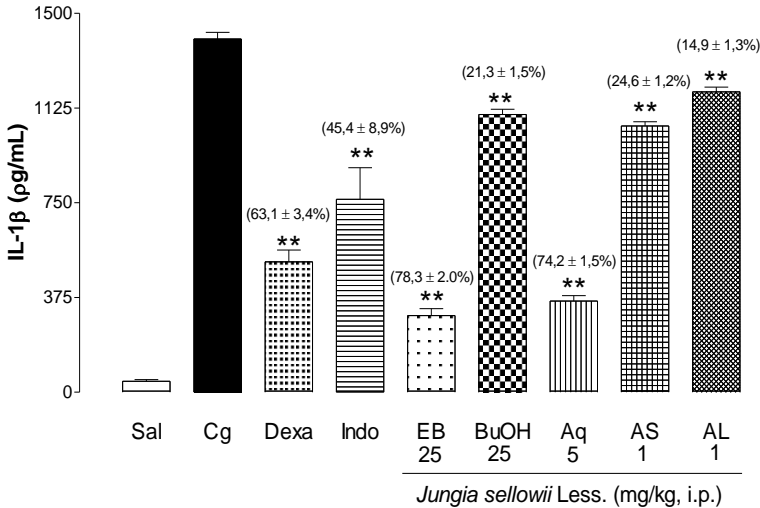
Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexta = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** $p < 0,01$. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.6 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Jungia sellowii* Less. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE IL-1 β , TNF- α e IL-17A

Em comparação com o grupo controle positivo, o EB, frações e compostos isolados de *Jungia sellowii* Less. foram capazes de inibir significativamente as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (Figura 22), TNF- α (Figura 23) e IL-17A (Figura 24), com os seguintes percentuais de inibição: IL-1 β : EB (25 mg/kg): 78,3 \pm 2,0%, BuOH (25 mg/kg): 21,3 \pm 1,5%, Aq (5 mg/kg): 74,2 \pm 1,5%, AS (1 mg/kg): 24,6 \pm 1,2% e AL (1 mg/kg): 14,9 \pm 1,3%; TNF- α : EB (25 mg/kg): 61,9 \pm 3,4%, BuOH (25 mg/kg): 50,7 \pm 2,7%, Aq (5 mg/kg): 55,1 \pm 2,7%, AS (1 mg/kg): 82,4 \pm 2,3% e AL (1 mg/kg): 63,3 \pm 2,7%; IL-17A: EB (25 mg/kg): 64,0 \pm 6,4%, BuOH (25 mg/kg): 61,6 \pm 6,6%, Aq (5 mg/kg): 54,3 \pm 2,6%, AS (1 mg/kg): 41,9 \pm 4,0% e AL (1 mg/kg): 21,2 \pm 5,4%, ($p < 0,01$).

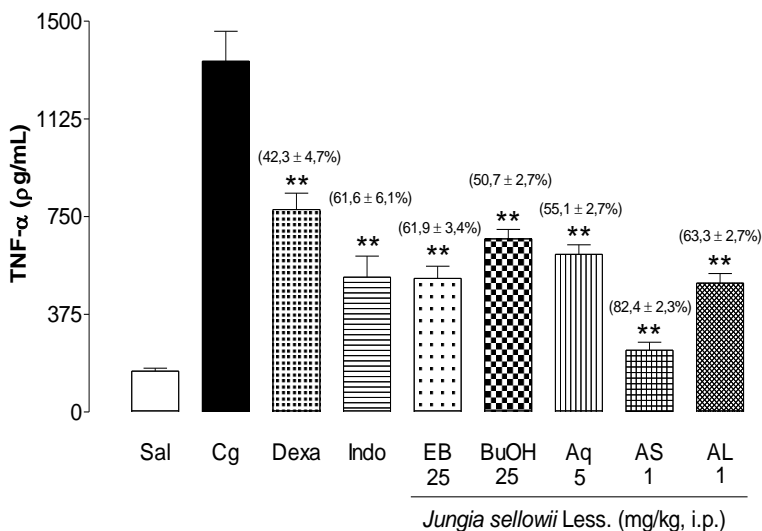
A Dexametasona e a Indometacina também reduziram as concentrações destas citocinas ($p < 0,01$) (Figuras 22, 23 e 24).

Figura 22 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 concentração de interleucina-1 β (IL1 β).



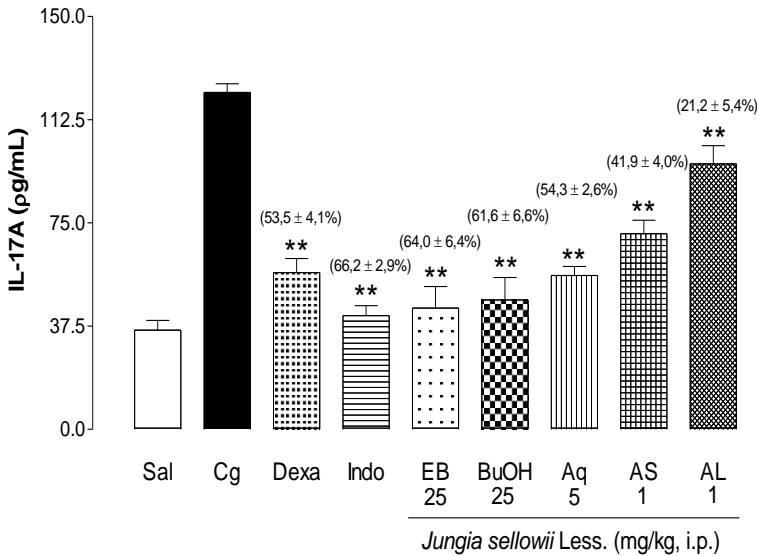
Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** p < 0,01. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 23 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 concentração de fator de necrose tumoral- α (TNF- α).



Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, 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.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** p < 0,01. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 24 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 a concentração de interleucina-17A (IL-17A).



Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, 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.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média ± e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** p < 0,01. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

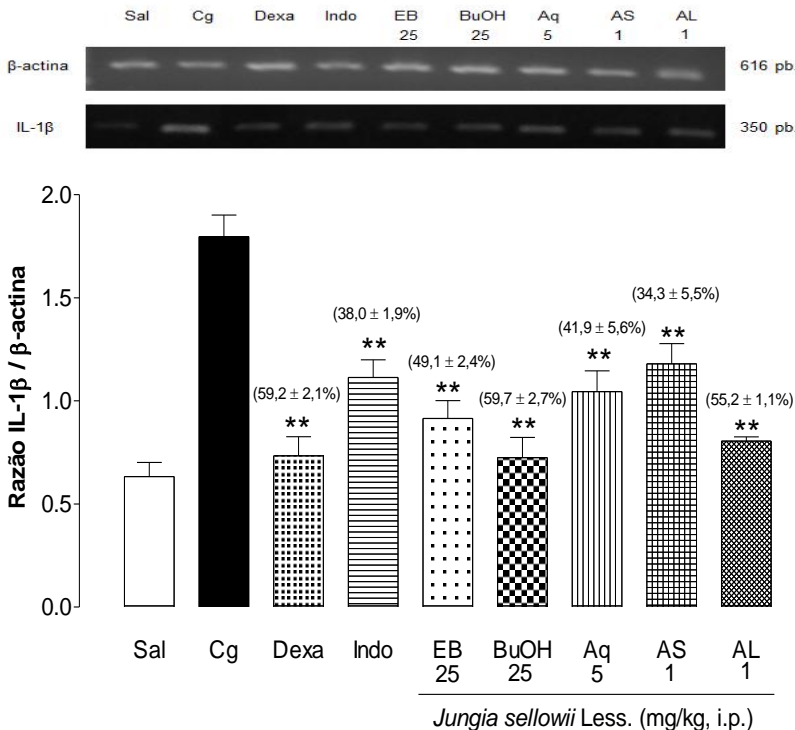
4.7 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Jungia sellowii* Less. SOBRE A TRANSCRIÇÃO DO RNAm PARA IL-1 β , TNF- α , IL-17A E iNOS

Uma vez que o EB, suas frações derivadas e os compostos isolados foram capazes de diminuir as concentrações das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , e IL-17A) e também reduziu as concentrações dos metabólitos do NO, investigamos se esta inibição também ocorreu em relação à expressão do RNAm para estes marcadores.

Os resultados mostraram que o EB, frações e compostos isolados de *Jungia sellowii* Less. reduziram de forma significativa a expressão do RNAm para IL- β (Figura 25), TNF- α (Figura 26), IL-17 (Figura 27) e iNOs (Figura 28), com os seguintes percentuais de inibição para mRNA IL-1 β : EB 25 mg/kg: 49,1 \pm 2,4%, BuOH 25 mg/kg: 59,7 \pm 2,7%, Aq 5 mg/kg: 41,9 \pm 5,6%, AS 1 mg/kg: 34,3 \pm 5,5% e AL 1 mg/kg: 55,2 \pm 1,1%; mRNA TNF- α : EB 25 mg/kg: 44,1 \pm 2,3%, BuOH 25 mg/kg: 58,1 \pm 2,1%, Aq 5 mg/kg: 43,7 \pm 1,6%, AS 1 mg/kg: 35,0 \pm 1,6% e AL 1 mg/kg: 50,1 \pm 2,1%; mRNA IL-17A: EB 25 mg/kg: 45,8 \pm 2,0%, BuOH 25 mg/kg: 59,9 \pm 1,6%, Aq 5 mg/kg: 35,7 \pm 1,6%, AS 1 mg/kg: 32,2 \pm 5,9% e AL 1 mg/kg: 39,6 \pm 4,3%; iNOS: EB 25 mg/kg: 49,4 \pm 1,6%, BuOH 25 mg/kg: 68,5 \pm 0,7%, Aq 5 mg/kg: 56,7 \pm 0,9%, AS 1 mg/kg: 49,1 \pm 1,1% e AL 1 mg/kg: 59,1 \pm 2,3%), ($p < 0,01$).

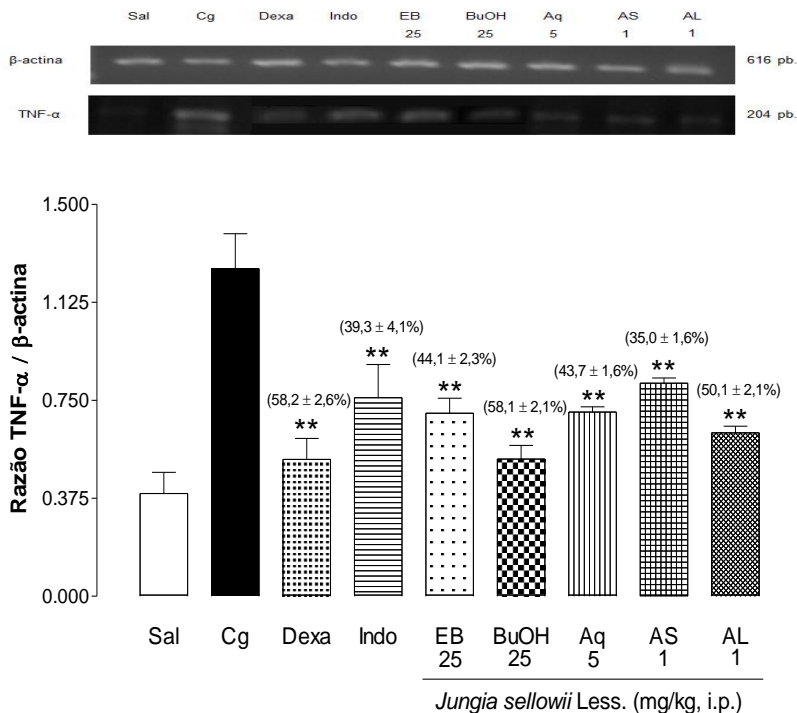
A Dexa e a Indo reduziram a expressão do RNAm destes parâmetros ($p < 0,01$) (Figuras 25, 26, 27 e 28).

Figura 25 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 expressão do RNAm para a interleucina-1 β (IL-1 β).



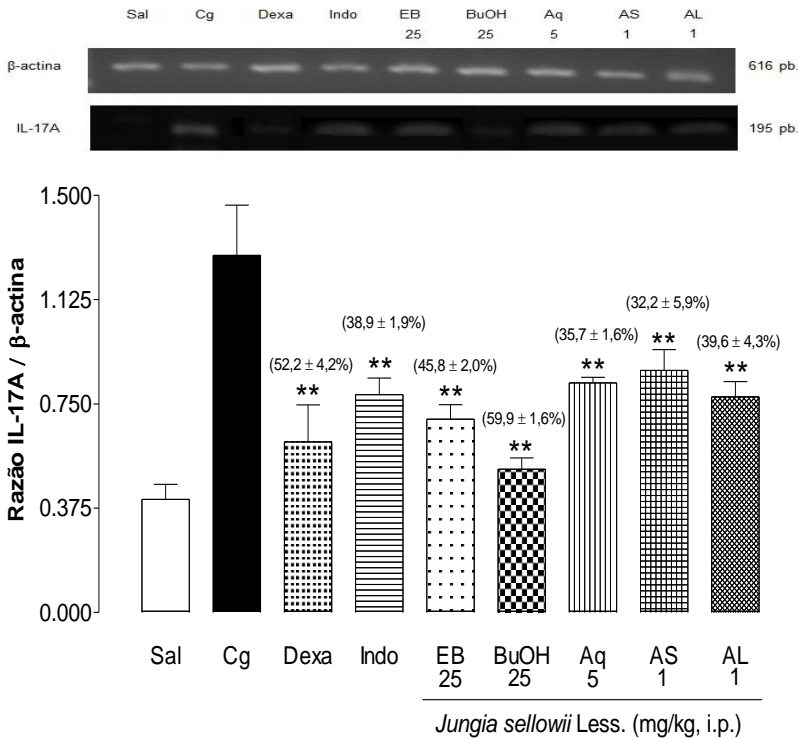
Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** p < 0,01. *Inset*, representa a visualização dos produtos de amplificação para o RNAm para a IL-1 β (RT-PCR) em gel de agarose corados com brometo de etídio. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 26 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 expressão do RNAm para o fator de necrose tumoral- α (TNF- α).



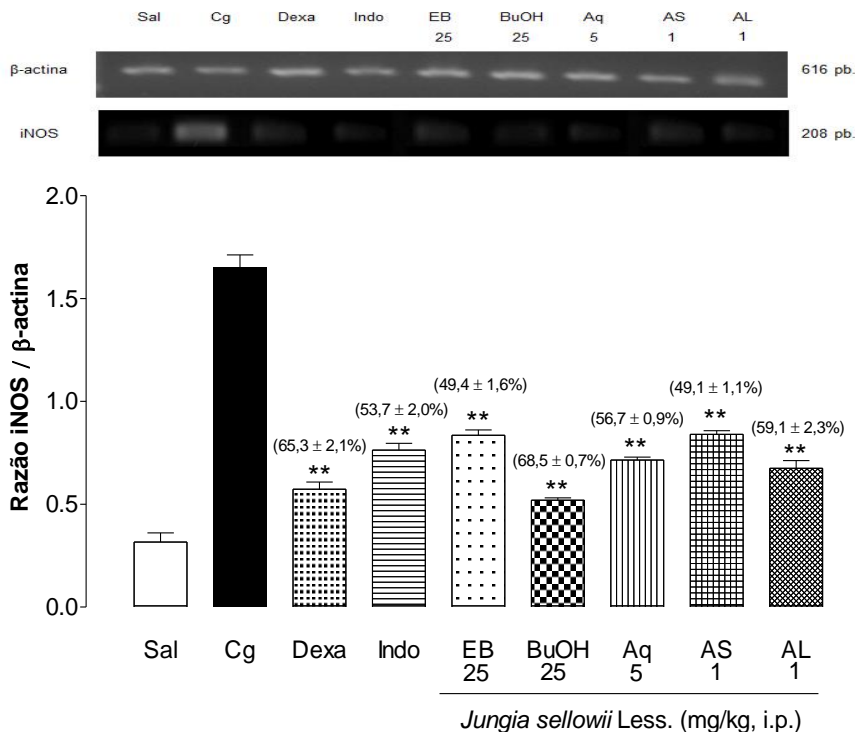
Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** p < 0,01. *Inset*, representa a visualização dos produtos de amplificação para o RNAm para o TNF- α (RT-PCR) em gel de agarose corados com brometo de etídio. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 27 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 a expressão do RNAm para interleucina-17A (IL-17A).



Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, 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.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** $p < 0,01$. *Inset*, representa a visualização dos produtos de amplificação para o RNAm para a IL-17A (RT-PCR) em gel de agarose corados com brometo de etídio. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 28 - Efeito do extrato bruto (EB: 25 mg/kg), fração butanol (BuOH: 25 mg/kg), fração aquosa (Aq: 5 mg/kg), ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg) isolados 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 expressão do RNAm para a óxido nítrico sintase induzida (iNOS).

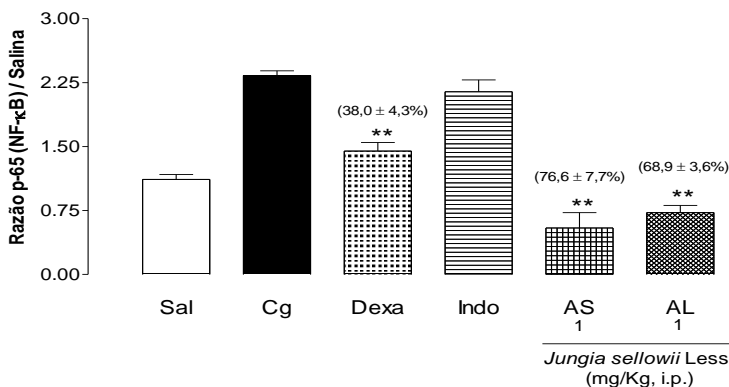


Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** p < 0,01. *Inset*, representa a visualização dos produtos de amplificação para o RNAm para a iNOS (RT-PCR) em gel de agarose corados com brometo de etídio. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.8 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 da fração aquosa das folhas de *Jungia sellowii* Less. estaria envolvido com a ativação do NF-κB foi realizado o experimento enfocando a fosforilação da proteína p65 (p-p65-NF-κB). Esta análise revelou que o AS e o AL inibiram significativamente a fosforilação do NF-κB p65, com um percentual de inibição de $76,6 \pm 7,7\%$ e $68,9 \pm 3,6\%$, respectivamente ($p < 0,01$) (Figura 29). A mesma inibição foi observada em animais previamente tratados com Dexa ($p < 0,01$), mas o mesmo resultado não foi observado nos animais que receberam tratamento prévio com Indo ($p > 0,05$) (Figura 29).

Figura 29 - Efeito dos compostos ácido succínico (AS: 1 mg/kg) e ácido láctico (AL: 1 mg/kg), isolados da fração aquosa (Aq) de *Jungia sellowii* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleuraral (i.pl.) sobre a fosforilação da proteína p65 (p-p65-NF-κB).



Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, 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.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas. Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. ** $p < 0,01$. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O modelo experimental escolhido para este estudo é caracterizado pelo influxo de neutrófilos na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, induzida pelo agente flogístico Cg (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). No protocolo experimental utilizado, avaliou-se apenas a primeira fase da resposta inflamatória para o estudo da ação anti-inflamatória do EB, suas frações derivadas e compostos isolados, uma vez que nesta fase ocorre o recrutamento de neutrófilos na cavidade pleural de camundongos e desta forma este modelo mimetiza a asma brônquica do tipo neutrofílica que ocorre em humanos. Desta forma, este é um bom modelo para a triagem de extratos de plantas que possuam propriedades anti-inflamatórias.

No presente estudo avaliou-se o efeito do EB, frações: Hex, DCM, AcOEt, BuOH, Aq e compostos isolados (AS e AL), obtido das folhas de *Jungia sellowii* Less.

Os resultados obtidos demonstraram pela primeira vez que a administração sistêmica do extrato bruto de *Jungia sellowii* Less., suas frações e os compostos isolados apresentou importante atividade anti-inflamatória. Este efeito foi demonstrado pela inibição do influxo de leucócitos principalmente de neutrófilos, além da inibição da exsudação no sítio da resposta inflamatória (cavidade pleural). A modulação desta resposta foi também associada à diminuição da atividade das enzimas MPO e ADA, e de mediadores pró-inflamatórios como NO, IL-1 β , TNF- α e IL-17A.

É importante destacar que entre as frações estudadas a fração Aq (5mg/kg) apresentou o efeito anti-inflamatório mais pronunciado, uma vez que em dose inferior esta fração inibiu os mesmos parâmetros inflamatórios que a fração BuOH (25 mg/kg) e que o CE (25 mg/kg). As frações Hex, DCM e AcOEt não foram efetivas na inibição da migração celular e, por isto, não foram utilizadas para análise dos outros parâmetros inflamatórios.

Ao compararmos a eficácia e o efeito do EB, suas frações derivadas e compostos isolados aos fármacos anti-inflamatórios Dexa e Indo verificamos que o EB e as frações BuOH e Aq demonstraram o mesmo efeito anti-inflamatório sobre todos os parâmetros inflamatórios estudados (migração celular,

exsudação, atividade da MPO e da ADA, quantificação/expressão para NO, IL-1 β , TNF- α e IL-17A).

Vale a pena resaltar ainda que a fração Aq foi mais eficaz do que a Indo na inibição da exsudação, da atividade da ADA, da concentração de IL-1 β e da expressão do RNAm para IL-1 β , TNF- α , e iNOS. O mesmo não ocorreu em relação à inibição da migração celular, atividade da MPO, concentração de NO $_x$, TNF- α , IL-17A e a expressão do RNAm para IL-17A. O motivo para estas diferenças ainda não está totalmente esclarecido, mas podemos concluir que esta fração contém substâncias com importante atividade anti-inflamatória.

Em outro protocolo experimental para análise da ativação de leucócitos foram escolhidas duas enzimas, MPO que está relacionada com a ativação de neutrófilos e a ADA, que está associada com a ativação de células mononucleares (FRÖDE; MEDEIROS, 2001). Nestes protocolos demonstramos que *Jungia sellowii* Less. inibiu a atividade de ambas as enzimas, desta forma demonstrando que o EB, suas frações derivadas e compostos isolados não apenas inibiram a migração de leucócitos como também reduziram os leucócitos ativados no local da inflamação.

Outro mediador importante durante o processo inflamatório e que foi alvo de nosso estudo é o NO, que regula o tônus vascular, aumenta a infiltração de células inflamatórias e estimula a síntese e a liberação de citocinas pelos leucócitos (REDINGTON, 2006; TRIPATHI; TRIPATHI; SINGH, 2007). O aumento na liberação de NO, via indução da iNOS tem sido relacionado a inflamação, contribuindo também para a formação do exsudato e do edema (CUZZOCREA et al., 2000). Desta forma, inibindo a indução da iNOS é possível diminuir a geração de NO e prevenir a liberação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (CONFORTI; MENICHINI, 2011). Neste sentido, *Jungia sellowii* Less. inibiu tanto os metabólitos do NO $_x$ como também a expressão do RNAm para iNOS, demonstrando que o EB, suas frações derivadas e compostos isolados possuem efeito anti-inflamatório e talvez antioxidante. Para este último efeito há a necessidade de avaliação, por exemplo, do monitoramento do consumo do radical livre DPPH.

Durante o processo inflamatório, a manutenção do recrutamento de leucócitos é realizada pela ativação do endotélio. Esta ativação é mediada pela geração de citocinas

como a IL-1 β , TNF- α e a IL-17A que auxiliam na propagação do processo inflamatório (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). O TNF- α é um importante indutor da expressão da ICAM-1, VCAM-1 e das E-Selectinas. As moléculas de adesão, por sua vez, estimulam a quimiotaxia de leucócitos para o local da inflamação (CANTAERT et al., 2010).

A IL-1 β , o TNF- α e a IL-17A são mediadores muito importantes na inflamação, pois induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias além das quimiocinas (CHU, 2013; KASZA, 2013; SONG; QIAN, 2013). Estas citocinas desempenham um papel importante na quimiotaxia de leucócitos e têm sido detectadas em altas concentrações no sítio da resposta inflamatória (MAZZON; CUZZOCREA, 2007; LIU et al., 2011b; GUO et al., 2013).

O mecanismo de ação do TNF- α está relacionado principalmente com a ativação do NF- κ B, levando a expressão de genes responsáveis pela síntese de mediadores pró-inflamatórios que controlam a inflamação (MEDZHITOV; HORNG, 2009). Sugere-se que a redução na concentração de TNF- α seja muito importante na progressão da resposta inflamatória que ocorre no modelo da pleurisia em camundongos, visto que a Cg possui a capacidade de ativar a via do NF- κ B (BHATTACHARYYA et al., 2010; BORTHAKUR et al., 2012).

A família de citocinas IL-17 está relacionada à patogênese de processos inflamatórios (SONG; QIAN, 2013). Na pleurisia induzida pela Cg, as células do pulmão expressam o gene da IL-17A, e existe uma concentração significativa desta citocina no lavado pleural dos animais inflamados por este agente flogístico (DALMARCO; CÓRDOVA; FRÖDE, 2011).

O estudo realizado por Mazzon e Cuzzocrea (2008), relaciona a diminuição da concentração de TNF- α com a inibição de leucócitos, exsudação, redução de NO, IL-1 β e expressão da iNOS, no pulmão de camundongos *knockout* para o receptor de TNF- α , TNF-R1, no modelo da pleurisia induzida pela Cg.

Nossos resultados demonstraram que *Jungia sellowii* Less. foi capaz de inibir tanto a produção quanto a expressão das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-17A) e da iNOS.

Na literatura, existe apenas um estudo, realizado por CASADO e colaboradores (2010), que demonstrou os efeitos anti-inflamatório e antioxidante de uma outra espécie, *Jungia paniculata*. Neste estudo, o efeito anti-inflamatório foi observado

utilizando modelos *in vivo* como o de edema de pata induzido por Cg em ratos e o de edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) em camundongos. Neste estudo observou-se inibição significativa do edema em ambos os modelos. Além disto, neste mesmo estudo, em experimentos realizados *in vitro* observou-se também uma diminuição significativa na atividade da fosfolipase A2 (PLA₂). Em relação à atividade antioxidante, estes mesmos autores, demonstraram que *Jungia paniculata* foi capaz de inibir em ensaios *in vitro* a captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), bem como o radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS⁺), além da inibição do ânion superóxido, demonstrando suas atividades anti-inflamatória e antioxidante.

Em nosso estudo foram isolados da fração aquosa os compostos AS e AL, uma vez que foi esta a fração com efeito anti-inflamatório mais importante. Ao avaliarmos o efeito destes compostos, comparando-os com a Dexa e a Indo, ambos os compostos foram mais eficazes do que a Indo, em relação ao efeito anti-inflamatório, na inibição dos parâmetros exsudação, concentração de TNF- α e inibição da fosforilação do NF- κ B. O mesmo não ocorreu com relação à inibição da migração celular, atividade da MPO, concentração de IL-1 β e IL-17A. O AL, mas não o AS, demonstrou ser mais eficaz, em comparação com a Indo, na inibição da atividade da ADA, concentração de NO_x, expressão do RNAm para IL-1 β , TNF- α , IL-17A e iNOS. No entanto, os mesmos apresentaram o mesmo efeito anti-inflamatório que a dexa.

Em estudo *in vitro* já foi relatado que o AS foi capaz de diminuir a capacidade de fagocitose das células polimorfonucleares e reduzir sua habilidade de resposta a estímulos quimiotáticos como o agente formil-metionil-leucil-fenilalanina e C5a, juntamente com uma inibição do *Burst* respiratório (ROTSTEIN et al., 1985). Nossos resultados estão de acordo com estes dados e revelam que o AS foi capaz de inibir a migração de leucócitos e a atividade da enzima MPO na cavidade pleural de animais inflamados.

Uma vez que as citocinas pró-inflamatórias são importantes mediadores que amplificam a resposta inflamatória e que o fator de transcrição NF- κ B é um dos fatores pelo qual as células que migram e/ou residentes quando ativadas liberam TNF- α e IL-1 β , analisamos se os compostos AS e AL poderiam

modular o NF- κ B e desta forma inibir a liberação destas citocinas no sítio inflamatório.

O NF- κ B desempenha um papel importante em processos fisiológicos, na resposta a injúrias e na inflamação (HOESL and SCHMID, 2013).

Estudos demonstraram que o AL pode reduzir as concentrações de RNAm do TNF- α e da IL-6 ao diminuir a fosforilação do I κ B α e bloquear a dissociação do complexo IKK, impedindo a ativação do NF- κ B (JIANG et al., 2013; LIU et al., 2011a; XU et al., 2013). Nossos resultados corroboram a estes achados, pois tanto o AL como o AS reduziram a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-17A), a expressão do RNAm para iNOS e inibiram o NF κ B, no modelo da pleurisia induzida pela Cg.

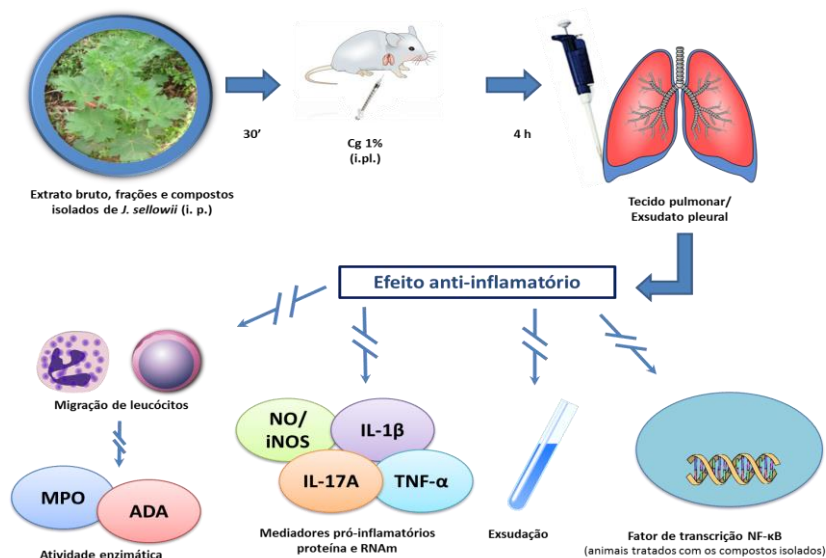
Sabe-se que o ácido cítrico, o ácido málico, o AS e o AL pertencem à classe dos ácidos carboxílicos. Estudos com o ácido cítrico e o ácido málico demonstraram efeito protetor destes ácidos no modelo de lesão do miocárdio por isquemia/reperfusão em ratos. Experimentos *in vivo*, com ratos, demonstraram ainda que o tratamento com ambos os ácidos (cítrico e málico) reduziu significativamente o tamanho da lesão do infarto do miocárdio, as concentrações séricas de TNF- α e a agregação plaquetária. Experimentos *in vitro* demonstraram ainda que o ácido cítrico e o ácido málico, reduziram significativamente a liberação de lactato desidrogenase e a taxa de apoptose em cardiomiócitos de ratos submetidos à hipóxia/reoxigenação. O efeito protetor observado foi relacionado à sua propriedade anti-inflamatória e anti-agregação plaquetária (TANG et al., 2013).

Vale a pena salientar que mesmo que os compostos isolados neste trabalho (AS e AL) tenham demonstrado efeito anti-inflamatório, neste modelo estudado, outros constituintes presentes no EB e suas frações derivadas também podem ter contribuído para este efeito.

6 CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo *in vivo* a demonstrar o efeito anti-inflamatório de *Jungia sellowii* Less. Este efeito ocorreu devido à inibição do influxo de leucócitos e da exsudação. Este efeito parece ser mediado pela inibição da atividade das enzimas MPO e ADA, bem como dos mediadores pró-inflamatórios (NO_x , IL-1 β , TNF- α e IL-17A), incluindo a modulação da expressão de seu RNAm. Além disto, os compostos isolados AS e AL mostraram o mesmo efeito anti-inflamatório, que parece incluir a inibição da via do NF- κ B. O ácido succínico e o ácido láctico parecem ser, em parte, responsáveis pelo efeito anti-inflamatório apresentado pela *Jungia sellowii* Less (Figura 30).

Figura 30 - Efeito anti-inflamatório de *Jungia sellowii* Less. no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.



ADA = adenosina desaminase, Cg = carragenina, IL-1 β = interleucina-1 β , IL-17 = interleucina-17, iNOS = óxido nítrico sintase induzida, MPO = mieloperoxidase, NF- κ B = fator nuclear- κ B, NO = óxido nítrico, RNAm = ácido ribonucléico mensageiro, TNF- α = fator de necrose tumoral α , seta interrompida (\nrightarrow) = inibição. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

REFERÊNCIAS

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V.; NAPOLITANI, G.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nature Immunology**, v. 8, p.942–949, 2007.

ANTONIOLI, L.; BLANDIZZI, C.; PACHER, P.; HASKÓ, G. 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.

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M.H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual Review of Immunology, California**, v. 27, p. 669-692, 2009.

BARNES, P.J. Inhaled Corticosteroids. **Pharmaceuticals**, v. 3, p. 514 - 540, 2010.

BENGHIAT, F.S.; CHARBONNIER, L.M.; VOKAER, B.; WILDE, V.; MOINE, A. Interleukin 17-producing T helper cells in alloimmunity. **Transplantation Reviews**, v. 23, p. 11-18, 2009.

BHATTACHARYYA, S.; LIU, H.; ZHANG, Z.; JAM, M.; DUDEJA, P. K.; MICHEL, G.; LINHARDT, R. J.; TOBACMAN, J. K. Carrageenan-induced innate immune response is modified by enzymes that hydrolyze distinct galactosidic bonds. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 906 – 913, 2010.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Polyacetylene compounds from *Jungia seteriana*. **Planta Medica**, v. 50, n. 2, p. 190-191, 1984.

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

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

BOLDIZSAR, F.; TALABER, G.; SZABO, M.; BARTIS, D.; PALINKAS, L.; NEMETH, P.; BERKI, T. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. **Immunobiology**, v. 215, n. 7, p. 521 - 526, 2010.

BORREGAARD, N.; Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657–670, 2010.

BORTHAKUR, A.; BHATTACHARYYA, S.; ANBAZHAGAN, A. N.; KUMAR, A.; DUDEJA, P.K.; TOBACMAN, J.K. Prolongation of carrageenan-induced inflammation in human colonic epithelial cells by activation of an NF- κ B-BCL10 loop. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 1300 – 1307, 2012.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 149–160, 2008.

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.

BROWN, R.A.; SPINA, D.; PAGE, C.P. Adenosine receptors and asthma. **British Journal of Pharmacology**. v. 153, p. 446-456, 2008.

BROWN, R. M.; SHORT, J. L. Adenosine A (2A) receptors and their role in drug addiction. **J Pharm Pharmacol**, v. 60, n. 11, p. 1409-1430, 2008.

BUDHU, A.; WANG, X. W. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. **Journal of leukocyte biology**, v. 80, p. 1-17, 2006.

BUZAS, M.; CHIRA, N.; DELEANU, C.; ROSCA, S. Identification and quantitative measurement by ¹H-NMR spectroscopy of several compounds present in Romanian wines. **Revista de Chimie**, v.54 n.10, p. 831-833, 2003.

CASADO, R.; LANDAL, A.; CALVOL, J. J.; DEL TERCENIO, M. del C.; CALVO, M. I. Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Jungia paniculata*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48 n. 8, p. 897-905, 2010.

CANTAERT, T. et al. Type I IFN and TNF- α cross-regulation in immune-mediated inflammatory disease: basic concepts and clinical relevance. **Arthritis Research & Therapy**, v.12, n.5, p.219, 2010.

CAVALCANTE, I.C. et al. Effect of novel A_{2A} adenosine receptor agonist ATL313 on Clostridium difficile toxin A-induced murine ileal enteritis. **Infection and Immunity**, v.74, p. 2606–2612, 2006.

CHAVAN, V., PATIL, N., KARNIK, N.D. Study of leukocyte hydrolytic enzymes in patients with acute stage of coronary heart disease. **Indian Journal of Medical Sciences**. v. 61, p. 73–82, 2007.

CHEN, Z.; TATO, C.M.; MUUL, L.; LAURENCE, A.; O'SHEA, J. J. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. **Arthritis Rheum**, v. 56, p. 2936–2946, 2007.

CHU, W. **Tumor necrosis factor**. *Cancer Letters*, v. 328, p. 222-225, 2013.

COMMINS, S.P.; BORISH, L.; STEINKE, J.W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. 53 - 72, 2010.

CONFORTI, F.; MENICHINI, F. Phenolic Compounds from Plants as Nitric Oxide Production Inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1137-1145, 2011.

CROME, S. Q.; WANG, A. Y.; LEVINGS, M. K. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v.159, p. 109-119, 2009.

CUA, D.J.; TATO, C.M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 479-489, 2010.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; CALABRO, G.; DUGO, L.; DE SARRO, A. VAN DE LOO, F. A. J.; CAPUTI, A. P. Inducible Nitric Oxide Synthase – Knockout Mice Exhibit Resistance to Pleurisy and Lung Injury Caused by Carrageenan. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, p. 1859-1866, 2000.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; HAKE, P.; SALZMAN, A. L.; SZABÓ, C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, p. 450-459, 1998.

D'AGOSTINO, M.; SENATORE, F.; DE FEO, V.; SIMONE, F. Flavonol glycosides from *Jungia panicullata*. **Fitoterapia**, v. 66, n. 3, p. 283-284.

DALE, D.C.; BOXER, L.; LILES, W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935 - 945, 2008.

DALMARCO, E.M.; ASTOLFI, G.; LIZ, R.; CÓRDOVA, C.M.M.; FRÖDE, T.S. Modulatory effect of mycophenolate mofetil on carrageenan-induced inflammation in the mouse air pouch model. **International Immunopharmacology**, v. 13, p. 476–482, 2012.

DALMARCO, E. M.; CÓRDOVA, C. M. M.; FRÖDE, T. S. Evidence of an anti-inflammatory effect of mycophenolate mofetil in a murine model of pleurisy. **Experimental Lung Research**, v.00, p. 1 – 9, 2011.

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.

DIAMANT, G.; DIKSTEIN, R. Transcriptional Control by NF- κ B: Elongation in Focus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1829, p. 937-945, 2013.

DONG, L. et al. Different doses of lipopolysaccharides regulate the lung inflammation of asthmatic mice via TLR4 pathway in alveolar macrophages. **The Journal of Asthma**, v. 46, n. 3, p. 229 - 233, 2009.

EKMEKCI, O.B.; DONMA, O.; SARDOĞAN, E.; YILDIRIM, N.; UYSAL, O.; DEMIREL, H.; DEMIR, T. Iron, nitric oxide, and myeloperoxidase in asthmatic patients. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 4, p. 462 - 467, 2004.

EVANS, H. G.; SUDDASON, T.; JACKSON, I.; TAAMS, L. S.; LORD, G. M. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 17034–17039, 2007.

FAITH, M.; SUKUMARAN, A.; PULIMOOD, A. B.; JACOB, M. 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.

FLAMMER, J.R.; ROGATSKY, I. Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. **Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 7, p. 1075 - 1086, 2011.

FREDHOLM, B.B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A.; KOLTZ, K. N.; LINDEN, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacological Reviews** v.53, n.4, p. 527-52, 2001.

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.

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

GLASS, C. K.; SAIJO, K.. Nuclear receptor transrepression in macrophages and T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 365-376, 2010.

GOLENIOWSKI, M. E.; BONGIOVANNI, G. A.; PALACIO, L.; NUÑEZ, C. O.; CANTERO, J. J. Medicinal plants from the "Sierra de Comechigones", Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, p. 324-341, 2006.

GOLEVA, E. et al. Corticosteroid-resistant asthma is associated with classical antimicrobial activation of airway macrophages. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 3, p. 550-559, 2008.

GOSSLAU, A.; LI, S.; HO, C.; CHEN, K. Y.; RAWSON, N. E. 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.; WAGNER, D. A.; GLOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. B.. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GUO, J.; GU, N.; CHEN, J.; SHI, T.; ZHOU, Y.; RONG, Y.; ZHOU, T.; YANG, W.; GUI, X.; CHEN, W. Neutralization of interleukin-1 beta attenuates silica-induced lung inflammation and fibrosis in C57BL/6 mice. **Arch Toxicol**, v. 87, n. 11, p. 1963-1973, 2013.

HAEGENS, A.; HEERINGA, P.; SUYLEN, R. J. V.; STEELE, C.; ARATANI, Y.; O'DONOGHUE, R. J. J.; MUTSAERS, S. E.; MOSSMAN, B. T.; WOUTERS, E. F. M.; VERNOOY, J. H. J. Myeloperoxidase Deficiency Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Inflammation and Subsequent Cytokine and Chemokine Production. **Journal of Immunology**, v. 182, p. 7990-7996, 2009.

HAMMOND, G. B.; FERNÁNDEZ, I. D.; VILLEGAS, L. F.; VAISBERG, A. J. A survey of tradicional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 17-30, 1998.

HASKÓ, G.; PACHER, P.; DEITCH, E.A.; VIZI, E. S. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, p. 264-275, 2007.

HENRIQUES, M.G. et al. Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 99, n. 1, p. 164–168, 1990.

HOESEL, B.; SCHMID, J. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 86, p. 1-15, 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.

JIANG, J.; XU, G.; SHI, Y.; QIAO, Y.; HU, G.; REN, X. 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 Anatomica Sinica**, v. 44, n. 2, p. 204-209, 2013.

KALA, C. P.; DHYANI, P. P.; SAJWAN, B. S. Developing the medicinal plants sector in northern India: challenges and opportunities. **J Ethnobiol Ethnomed**, v. 2, p. 32, 2006.

KASZA, A. IL-1 and EGF regulate expression of genes important in inflammation and cancer. **Cytokine**, v. 62, p. 22-33, 2013.

KATINAS, L.; PRUSKI, J.; SANCHO, G.; TELLERÍA, M. C. The Subfamily Mutisioideae (Asteraceae). **Botanical Review**, v. 74, p. 469-716, 2008.

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

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th 17 Cells. **Annual Review of Immunology**, v.27, p. 485-517, 2009.

KVIETYS, P.; GRANGER, D.N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p. 556-592, 2012.

LAINE, L.; SMITH, R.; MIN, K.; CHEN, C.; DUBOIS, R. W. Systematic review: the lower gastrointestinal adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Aliment Pharmacology Therapy**, v. 24, n. 5, p. 751-67, 2006.

LAPA, F. R.; SILVA, M. D.; CABRINI, D. A.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory effects of purine nucleosides, adenosine and inosine, in a murine model of pleurisy: evidence for the role of

adenosine A2 receptors. **Purinergic Signalling**, v. 8, p. 693-704, 2012.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 1, p. 16–26, 2006.

LEE, I.; YANG, C. Inflammatory Signalings Involved in Airway and Pulmonary Diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p.1-12, 2013.

LEE, K.H. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. **Journal of Natural Products**. v. 73, n. 3, p. 500-516, 2010.

LENTZ, A. K.; FEEZOR, R. J. Principles of Immunology. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 18, p. 451-460, 2003.

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.

LIU, H.; ROHOWSKY-KOCHAN, C. Regulation of IL-17 in human CCR6(+) effector memory T cells. **J Immunol**, v. 180, p. 7948–7957, 2008.

LIU, J.; XUE, J-Z.; ZHU, Z-N.; HU, G.; REN, X-M. Lactic Acid Inhibits NF- κ B Activation by Lipopolysaccharide in Rat Intestinal Mucosa Microvascular Endothelial Cells. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. 6, p. 954-959, 2011a.

LIU, Y.; MEI, J.; GONZALES, L.; YANG, G.; DAI, N.; WANG, P.; ZHANG, P.; FAVARA, M.; MALCOM, K. C.; GUTTENTAG, S.; WORTHEN, G. S. IL-17A and TNF- Exert Synergistic Effects on Expression of CXCL5 by Alveolar Type II cells in Vivo and In Vitro. **J Immunol**, v. 186, p. 3197-3205, 2011b.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-267, 1951.

MALLE, E.; FURTMÜLLER, P. G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 6, p. 838 - 854, 2007.

MARCHANT, R.; ALMEIDA, L.; BEHLING, H.; BERRRIO, J. C.; BUSH, M.; CLEEF, A.; DUIVENVOORDEN, J.; KAPPELLE, M.; DE OLIVEIRA, P.; DE OLIVEIRA-FILHO, A. T.; LOZANO-GARCIA, S.; HOOGHIEMSTRA, H.; LEDRU, M.; LUDLOW-WIECHERS, B.; MARKGRAF, V.; MANCINI, V.; PAEZ, M.; PRIETO, A.; RANGEL, O.; SALGADO-LABOURIAU, M. L. 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.

MAZZON, E.; ESPOSITO, E.; DI PAOLA, R.; MUIÀ, C.; CRISAFULLI, C.; GENOVESE, T.; CAMINITI, R.; MELI, R.; BRAMANTI, P.; CUZZOCREA, S. Effect of tumour necrosis factor- α receptor 1 genetic deletion on carrageenan-induced acute inflammation: a comparison with etanercept. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 153, n. 1, p. 136 - 149, 2008.

MAZZON, E.; CUZZOCREA, S. Role of TNF- α in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. **Respiratory Research**, v. 8, n. 75, p.1-19, 2007.

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.

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.

MENEGAZZI, M.; DI PAOLA, R.; MAZZON, E.; MUIÀ, C.; GENOVESE, T.; CRISAFULLI, C.; SUZUKI, H.; CUZZOCREA, S. *Hypericum perforatum* attenuates the development of

carrageenan-induced lung injury in mice. **Free radical biology & medicine**, v. 40, p. 740-753, 2006.

MIOSSEC, P.; KOLLS, J. K. Targeting IL-17 and T_H17 cells in chronic inflammation. **Nature Reviews**, v. 11, p. 763-776, 2012.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, n. 1, p. 62 - 71, 2001.

MISHRA, B.B.; TIWARI, V.K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769 - 4807, 2011.

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. 2011.

MOUSA, S. A.; GONCHARUK, O.; MILER, D. Recent advances of TNF-alpha antagonists in rheumatoid arthritis and chronic heart failure. **Expert Opin Biol ther**, v. 5, p. 617-625, 2007.

NAUDÉ, P.J. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. **FEBS Journal**, v. 278, n. 6, p. 888-898, 2011.

NAUSEEF, W. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological Reviews**, v. 219, p. 88-102, 2007.

NEMBRINI, C.; MARSLAND, B. J.; KOPF, M. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 5, p. 986-994, 2009.

NEWCOMB, D. C.; PEEBLES Jr, R. S. Th17-mediated inflammation in asthma. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, p. 1-6, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-355, 2012.

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

NORD, L. I.; VAAG, P.; DUUS, J. Quantification of Organic and Amino Acids in Beer by ^1H NMR Spectroscopy. **Anal Chemistry**, v.76, n.16, p. 4790-4798, 2004.

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

OLIVEIRA, S. H. P. et al. Neutrophil migration induced by IL-1 β depends upon LTB $_4$ released by macrophages and upon TNF- α and IL-1 β released by mast cells. **Inflammation**, v. 31, n. 1, p. 36-46, 2008.

PAPAYANNOPOULOS, V.; ZYCHLINSKY, A. NETs: a new strategy for using old weapons. **Trends of Immunology**. v. 30, n. 11, p. 513-21, 2009.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 1, p. 62 - 70, 2009.

POBER, J.; SESSA, W. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 803-815, 2007

PROKOPOWICZ, Z.; MARCINKIEWICZ, J.; KATZ, D. R.; CHAIN, B. M. Neutrophil Myeloperoxidase: Soldier and Statesman. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 60, n. 1, p. 43-54, 2012.

QUAX, R. A.; MENENSCHIJN, L.; KOPER, J. W.; HAZES, J. M.; LAMBERTS, S. W. J.; van ROSSUM, E. F. C.; FEELDERS, R. A. 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.; CURRIE, J.L.; SHAFFER, A.F.; ISAKSON, P.C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, p. 723-741, 1993.

REDINGTON, A. E. Modulation of nitric oxide pathways: Therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Eur J Pharmacol**, v. 533, p. 263–276, 2006.

REHECHO, S.; URIARTE-PUEYO, I.; CALVO, J.; VIVAS, L. A.; CALVO, M. I. 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.

REN, K.; TORRES, R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 57-64, 2009.

RICCIARDOLO, F. L. M. Multiple roles of nitric oxide in the airways. **Thorax**, v. 58, p. 175-182, 2003.

ROTSTEIN, O. D.; PRUETT, T. L.; FIRGEL, V. D.; NELSON, R. D.; SIMMONS, R. L. Succinic acid, a metabolic by-product of Bacteroides species, inhibits polymorfonuclear leukocyte function. **Infection and Immunity**, v. 48, n. 2, p. 402-408, 1985.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology**. v. 32, n. 10, 2011.

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.

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

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.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 427-439, 2010.

SONG, X.; QIAN, Y. IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases. **Cellular Signalling**, v. 25, p. 2335-2347, 2013.

SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. **Journal of Pathology and Bacteriology**, London, v. 72, p. 367-380, 1956.

STEWART, L.; KATIAL, R. K. Exhaled Nitric Oxide. **Immunology and Allergy Clinics of North America**. v. 32, n. 3, p. 347–362, 2012

STEINKE, J.W.; BORISH, L. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 2, p. 441-445, 2006.

SUGIURA, H.; ICHINOSE, M. Nitrate stress in inflammatory lung diseases. **Nitric Oxide**, v. 25, p. 138–144, 2011.

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, C. X. et al. Role of A_{2B} adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. **J. Clin. Invest.** 116, 2173–2182, 2006.

TANG, X.; LIU, J.; DONG, W.; LI, P.; LI, L.; LIN, C.; ZHENG, Y.; HOU, J.; LI, D. The Cardioprotective Effects of Citric Acid and L-Malic Acid on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

TEDER, P.; VANDIVIER, R. W.; JIANG, D.; LIANG, J.; COHN, L.; et al. Resolution of lung inflammation by CD44. **Science**, v. 296, p. 155–158, 2002.

TELLES, R. W.; FERREIRA, G. A.; DA SILVA, N. P.; SATO, E. I. Increased plasma myeloperoxidase levels in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology International**, v. 30, n. 6, p. 779-84, 2010.

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, L. K.; SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.51, p. 443-452, 2007.

TSUJI, R.F. et al. Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, n. 2, p. 249 - 258, 2003.

VAN DER VEEN, B.S.; WINTHER, M.P.J.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 11, n. 11, p. 1-39, 2009.

WAJANT, H.; SCHEURICH, P. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway. **FEBS Journal**, v. 278, n. 6, p. 862-876, 2011.

WANG, Y.; LIU, Y. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, p. 697–702, 2008.

WILLIAMS, L. N.; PETTERSON, K. A.; ROBERTS, J. D. The Conformations of 1,4-Butanedioic Acid as a Function of Solvent Polarity in a Series of Alcohols as Determined by NMR

Spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 106, n. 33, p. 7491-7493, 2002.

WILSON, N.J.; BONIFACE, K.; CHAN, J. R.; et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. **Nat Immunol**, v. 8, p. 950–957, 2007.

WITKO-SARSAT, V. et al. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 3, p. 117-124, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Traditional medicine, Fact sheet, n. 134, 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>>. Acesso em: 16/08/2013.

XU, G-Y.; JIANG, J-Q.; WANG, M.; LI, J.; SU, J-L.; REN, X-M. 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.

YBARRA, M. I.; CATALAN, C. A. N.; DIAZ, J. G.; HERZ, W. A cyperane and trixanes from *Jungia polita*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3627-3629, 1992.

YEGUTKIN, G.G. Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signaling cascade. **Biochim.Biophys. Acta**, v. 1783, n. 5, p. 673-694, 2008.

ZAMANI, B.; JAMALI, R.; JAMALI, A. Serum adenosine deaminase may predict disease activity in rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v. 32, n. 7, p. 1967-1975, 2012.

ANEXO A - RESUMOS APRESENTADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

1. **Nader, M.**; VICENTE, G.; MACHADO B. A.; BIAVATTI, M. W.; FRÖDE, T. S. PHARMACOLOGICAL STUDY OF *Jungia sellowii* Less. IN A MURINE MODEL OF PLEURISY INDUCED BY CARRAGEENAN. IN : 11th Congress on inflammation and XXVIII Congress of the Brazilian society of Immunology, 2013, Natal.
2. Liz, R.; **Nader, M.**; Horst, H.; Pizzolatti, M. G.; Girard, D.; Fröde, T.S. ACTIVATION OF HUMAN NEUTROPHILS BY THE CRUDE HYDROALCOHOLIC EXTRACT AND AN ALKALOID-ENRICHED FRACTION FROM *Esenbeckia leiocarpa* Engl. In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia - SP. XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012.

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO:
 “*Jungia sellowii* Less. suppresses the carragenan-induced inflammatory response in the mouse model of pleurisy”, ao periódico *Planta Medica*.

Manuscript submitted to editorial office



***Jungia sellowii* suppresses the carrageenan-induced inflammatory response in the mouse model of pleurisy**

Journal:	<i>Planta Medica</i>
Manuscript ID:	PLAMED-2014-03-0257-OP
Manuscript Type:	Original Papers
Date Submitted by the Author:	10-Mar-2014
Complete List of Authors:	Nader, Marina; Federal University of Santa Catarina, Clinical Analysis Vicente, Geison; Federal University of Santa Catarina, Clinical Analysis da Rosa, Julia; Federal University of Santa Catarina, Clinical Analysis de Lima, Tamires; Federal University of Santa Catarina, Pharmaceutical Science Barbosa, Alyne; Federal University of Santa Catarina, Pharmaceutical Science Dalmarco, Eduardo; Federal University of Santa Catarina, Clinical Analysis Biavatti, Maique; Federal University of Santa Catarina, Pharmaceutical Science Frode, Tania; Universidade Federal de Santa Catarina, Análises Clínicas
Keywords:	Enzyme Inhibition < Molecular Targets and Activities, Transcription Factors < Molecular Targets and Activities, Animal Pharmacology < Pharmacology, NMR < Natural Products Analysis, Inflammation < Pharmacology, Cytokines < Molecular Targets and Activities