

Marcus Vinicius Pereira dos Santos Nascimento

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *Polygala
sabulosa* A.W. BENNETT NO MODELO DE PLEURISIA
INDUZIDA POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração Análises Clínicas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco

Florianópolis
2015

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

Nascimento, Marcus Vinicius Pereira dos Santos
Estudo do efeito anti-inflamatório da Polygala sabulosa
A.W. Bennett no modelo de pleurisia induzida pela
carragenina em camundongos / Marcus Vinicius Pereira dos
Santos Nascimento ; orientador, Eduardo Monguilhott
Dalmarco - Florianópolis, SC, 2015.
125 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. Polygala sabulosa. 4.
Efeito anti-inflamatório. 5. Camundongos. I. Dalmarco,
Eduardo Monguilhott. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

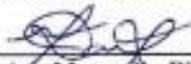
**“Atividade anti-inflamatória da Polygala sabulosa
A.W. Bennett no modelo da pleurisia induzida pela
carragenina em camundongos”**

POR

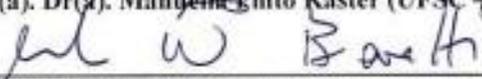
Marcus Vinicius Pereira dos Santos Nascimento

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

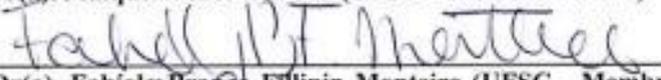
Banca Examinadora:



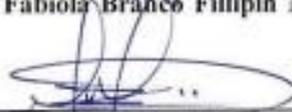
Prof(a). Dr(a). Manuella Pinto Kaster (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Maique Weber Biavatti (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Fabíola Branco Fillipin Monteiro (UFSC - Membro
Titular)



Prof(a). Dr(a). Eduardo Monguilhott Dalmarco (UFSC –
Orientador(a))

Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2015.

Este trabalho é dedicado aos meus pais e avós por serem meus exemplos de dedicação, persistência e conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado neste caminho de Vontade e Amor. Agradeço pela oportunidade de trabalhar com o que amo e desta forma realizar o começo de um sonho.

Agradeço a meus pais, avós maternos e paternos por concederem todo apoio para que mais esta etapa de minha vida pudesse se completar. Tenham certeza de que no decorrer destes dois anos de mestrado foram o exemplo de perseverança e força de vocês que me guiaram através dos momentos de hesitação e desânimo. Agradeço diariamente por ter vocês como pilares para o sucesso que busco. Eu vos amo incondicionalmente;

A Ana Caroline Klemz, minha namorada, por ser minha fiel companheira e âncora nos momentos de titubeação. Agradeço não somente pelo apoio, mas também por me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Eu te admiro tanto quanto te amo;

Ao meu orientador, prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, pelas oportunidades a mim concedidas e pela confiança depositada nestes dois anos. Obrigado por ser o mestre e exemplo de pesquisador que você é;

A prof^ª. Dr^ª. Tânia Silvia Fröde pela experiência e ensinamentos compartilhados, e por ceder o seu laboratório para a realização deste trabalho;

A todos os colegas do Laboratório de Pesquisa em Imunologia (LAPI) por terem me acolhido no início desta jornada e terem me ensinado as metodologias necessárias para que esta dissertação pudesse ser feita. Agradeço especialmente a Fabio Arruda e Silva, Ana Beatriz G. Luz e Bruna Baratto por terem cooperado diretamente para este trabalho;

Aos meus grandes amigos Anderson Nagel, Andreas O. Hoeltgebaum, Andreas F. Müller, Rafael Augusto M. Jorge, Ricardo Guilherme B. Carabaca e Werner Arnold Junior (O Clube do Graveto) por servirem de apoio sólido e válvula de escape durante este período, além dos momentos de descontração;

A Dalila Venzke e ao prof. Dr. Moacir Pizzolatti por fornecer o material vegetal e pela parceria neste trabalho;

Ao Gustavo Queiroz, pela realização dos experimentos com o CLAE-DAD e conhecimento compartilhado;

A prof^ª. Dr^ª. Tânia C. Pasa pelo apoio e por disponibilizar os equipamentos de seu laboratório;

Aos colegas do Laboratório de Estudo de Interações entre Micro e Macro Moléculas, que sempre estiveram dispostos a me ajudar com os equipamentos e com as técnicas;

Enfim, gostaria de agradecer a todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Nada no mundo se compara à persistência. Nem o talento; não há nada mais comum do que homens malsucedidos e com talento. Nem a genialidade; a existência de gênios não recompensados é quase um provérbio. Nem a educação; o mundo está cheio de negligenciados educados. A persistência e determinação são, por si sós, onipotentes.”

Calvin Coolidge

RESUMO

A planta *Polygala sabulosa* A.W. Bennett, popularmente conhecida como “timutu-pinheirinho”, é uma planta característica da zona de campos do planalto catarinense e é tradicionalmente utilizada para tratar afecções dos rins, intestino e pulmões. O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito anti-inflamatório desta espécie e analisar o provável mecanismo de ação de seu composto majoritário, no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Com este objetivo, o material vegetal foi submetido a extração por maceração com etanol 96% a temperatura ambiente por 7 dias para obtenção do extrato bruto hidroalcoólico (EBH). O EBH foi então submetido a extração sólido-líquido com solventes de diferentes polaridades para obtenção de três diferentes frações, sendo elas: fração hexânica (Hex), fração acetonica (Ac) e fração metanólica (MeOH). O composto 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC) foi isolado da fração Ac, identificado comparando-se dados de RMN H^1 e C^{13} com literatura já publicada e quantificado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD). Para avaliação do efeito anti-inflamatório desta espécie foi realizada a quantificação de leucócitos totais e neutrófilos, além da quantificação de exsudato na cavidade pleural. Além disso, técnicas padronizadas descritas na literatura foram empregadas com intuito de verificar o efeito da *P. sabulosa* sobre a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA) e sobre as concentrações de metabólitos do óxido nítrico (NO_x), e das citocinas pró-inflamatórias: fator necrose tumoral *alpha* (TNF- α) e interleucina 1 *beta* (IL-1 β). Com intuito de propor o mecanismo de ação do composto majoritário desta espécie, a atividade da PC foi avaliada sobre a expressão de mRNA das citocinas TNF- α , IL-1 β e da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), além de sua capacidade inibitória sobre a fosforilação da subunidade p65 do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) e da proteína quinase induzida por mitógeno p38 (p38 MAPK). Todos os parâmetros inflamatórios foram avaliados 4 horas após a indução da pleurisia. Em todos os experimentos realizados a dexametasona (Dex 0,5 mg/kg, i.p.) foi utilizada como fármaco de referência anti-inflamatória. Para análise estatística dos resultados utilizou-se o teste de análise variância ANOVA, complementados pelo pós teste Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. O EBH, as frações Hex, Ac e MeOH e o composto isolado PC foram capazes de reduzir a migração leucocitária para a cavidade pleural às custas da inibição de neutrófilos, além da exsudação ($p < 0,05$). Com exceção do EBH que não foi capaz de inibir a

exsudação em nenhuma das doses testadas ($p > 0.05$). Ainda, o EBH, frações e a PC inibiram de forma significativa as atividades da MPO ($p < 0,01$) e ADA ($p < 0,01$), e as concentrações de NO_x ($p < 0,01$), além das citocinas $\text{TNF-}\alpha$ ($p < 0,01$) e $\text{IL-1}\beta$ ($p < 0,01$). Já o composto isolado PC foi capaz de reduzir a expressão de mRNA do $\text{TNF-}\alpha$ ($p < 0,01$), $\text{IL-1}\beta$ ($p < 0,01$) e iNOS ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo Cg. Finalmente, o composto PC ainda inibiu significativamente a fosforilação da subunidade p65 do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ($p < 0,01$) e a fosforilação da p38 MAPK ($p < 0,05$). Os resultados do presente estudo demonstraram que a *P. sabulosa* possui atividade anti-inflamatória importante e este efeito pode ser, ao menos em parte, atribuído a seu composto majoritário que demonstrou atividade inibitória sobre duas importantes cascatas de sinalização do processo inflamatório deflagrado pela carragenina, o $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e a p38 MAPK.

Palavras-chave: Pleurisia, camundongos, carragenina, *Polygala sabulosa*, 7-preniloxi-6-metoxicumarina.

ABSTRACT

Study of the anti-inflammatory effect of *Polygala sabulosa* A.W. Bennett in the model of pleurisy induced by carrageenan in mice.

Polygala sabulosa A.W. Bennett, popularly known as "timutu-pinheirinho", is a characteristic species of the field area of Santa Catarina plateau and is traditionally used to treat diseases of the kidneys, intestines and lungs. The objective of this study was to investigate the anti-inflammatory effect of this species and analyze the likely mechanism of action of its major compound in the pleurisy model induced by carrageenan in mice. To this end, the plant material was subjected to extraction by maceration with 96% ethanol at room temperature for 7 days to obtain the crude hydroalcoholic extract (CE). The CE was then subjected to solid-liquid extraction with solvents of different polarities to obtain three different fractions, namely: hexane fraction (Hex) acetonetic fraction (Ac) and methanol fraction (MeOH). The compound 7-prenyloxi-6-methoxycoumarin (PC) was isolated from the Ac fraction, identified by comparing data from NMR H^1 and C^{13} with published literature and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC-DAD). To evaluate the anti-inflammatory effect of this species the quantification of total leukocytes and neutrophils, in addition to the quantification of exudate in the pleural cavity were performed. In addition, standard techniques described in the literature were used in order to verify the effect of *P. sabulosa* upon the activity of the enzymes myeloperoxidase (MPO) and adenosine-deaminase (ADA), upon the nitric oxide metabolites concentrations (NO_x), and pro-inflammatory cytokines: tumor necrosis factor *alpha* (TNF- α) and interleukin 1 *beta* (IL-1 β). With intention to propose the mechanism of action of the major compound of this species, the PC activity was evaluated upon the mRNA expression of TNF- α , IL-1 β and inducible nitric oxide synthase (iNOS), and its inhibitory ability upon the phosphorylation of the p65 subunit of nuclear factor *kappa* B (NF-kB) and the protein kinase-induced p38 mitogen (p38 MAPK). All inflammatory parameters were assessed 4 hours after pleurisy induction. In all of these work procedures, dexamethasone (Dex 0.5 mg / kg, ip) was used as anti-inflammatory reference drug. For statistical analysis, we used the analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls post-hoc test. p values <0.05 were considered significant. The CE, Hex, Ac and MeOH fractions and the isolated compound, PC, were capable of reducing leukocyte migration

into the pleural cavity due the inhibition of neutrophils, besides the exudation ($p < 0.05$). With the exception of CE that was not able to inhibit exudation in any of the tested doses ($p > 0.05$). Further, the CE, fractions and PC significantly inhibited MPO ($p < 0.01$) and ADA ($p < 0.01$) activities and NO_x concentrations ($p < 0.01$), also the cytokines TNF- α ($p < 0.01$) and IL-1 β ($p < 0.01$). The isolated compound PC was able to inhibit mRNA expression of TNF- α ($p < 0.01$), IL-1 β ($p < 0.01$) and iNOS ($p < 0.01$). Finally, the PC compound significantly inhibited the phosphorylation of the p65 subunit of NF- κ B ($p < 0.01$) and p38 MAPK ($p < 0.05$). The results of this study showed that *P. sabulosa* has important anti-inflammatory activity and this effect may be, at least in part, attributed to its major compound that shown inhibitory activity against two important signaling cascades in the inflammatory process produced by carrageenan, the NF- κ B and p38 MAPK.

Keywords: Pleurisy, mice, carrageenan, *Polygala sabulosa*, 7-prenyloxi-6-methoxycoumarin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de agentes oxidantes pela enzima mieloperoxidase	32
Figura 2. Vias metabólicas da formação de adenosina.....	34
Figura 3. Formação e efeitos do óxido nítrico na inflamação	36
Figura 4. Via de ativação canônica do NF- κ B	40
Figura 5. Via de ativação da p38 MAPK	43
Figura 6. Perfil temporal do modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos	46
Figura 7. Estrutura química da 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC).....	52
Figura 8. Protocolo experimental para curva dose-resposta do EBH, frações e composto isolado da <i>P. sabulosa</i> no modelo de pleurisia induzida pela carragenina.....	55
Figura 9. Protocolo experimental para curva tempo-resposta do EBH da <i>P. sabulosa</i> no modelo de pleurisia induzida pela carragenina.....	56
Figura 10. Protocolo experimental para determinação da atividade anti-inflamatória do EBH, frações e composto isolado da <i>P. sabulosa</i> no modelo de pleurisia induzida pela carragenina	57
Figura 11. Protocolo experimental para determinação do mecanismo de ação do composto isolado da <i>P. sabulosa</i> no modelo de pleurisia induzida pela carragenina.....	58
Figura 12. Cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) da <i>Polygala sabulosa</i>	69
Figura 13. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e exsudação (C).....	71
Figura 14. Efeito da fração hexânica (Hex) da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e exsudação (C)	72
Figura 15. Efeito da fração acetônica (Ac) da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e exsudação (C)	73
Figura 16. Efeito da fração metanólica (MeOH) da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e exsudação (C)	74
Figura 17. Efeito do composto isolado 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC) da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e exsudação (C)	75

Figura 18. Efeito da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	77
Figura 19. Efeito da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a atividade da enzima adenosina-deaminase (ADA).....	78
Figura 20. Efeito da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a as concentrações de nitrito/nitrato	79
Figura 21. Efeito da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a as concentrações de TNF- α	80
Figura 22. Efeito da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a as concentrações de IL-1 β	81
Figura 23. Efeito do composto isolado da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a expressão de mRNA do TNF- α (A), IL-1 β (B) e iNOS (C).....	82
Figura 24. Efeito do composto isolado da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B.....	84
Figura 25. Efeito do composto isolado da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a p38 MAPK total e fosforilada.....	85
Figura 26. Resumo gráfico da proposta para o mecanismo de ação da 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC), composto isolado da <i>Polygala sabulosa</i>	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônia
Ac	Fração acetônica da <i>Polygala sabulosa</i>
ADA	Adenosina Deaminase
ALR	Receptor do tipo AIM2-Like
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Método estatístico de análise de variância
ATF 1/2/6	Fatores de transcrição dependentes de AMP
ATP	Adenosina trifosfato
BAFF	Fator ativador de células B
BALB/c	Linhagem de camundongos BALB/c
BMK1	Quinase <i>Big mitogen-activated protein kinase</i>
BV-2	Células de micróglia tipo BV-2
C ₁₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₂	Etilenodiamina
C57BL/6	Linhagem de camundongos C57BL/6
C ₆ H ₈ N ₂ O ₂ S	Sulfonamida
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD40L	Ligante CD40
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comite de ética no uso de animais
Cg	Carragenina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
COX 1	Ciclooxigenase 1
COX 2	Ciclooxigenase 2
C-Rel	Monômero do NF-κB (subunidade)
CuSO ₄	Sulfato de cobre
CV	Coefficiente de variação
DAD	Arranjo de diodos
DAMPs	Constituintes moleculares associados a dano
DDIT3	Fator de transcrição induzido por dano ao DNA 3
DEPC	Dietilpirocarbonato
Dex	Dexametasona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EBH	Extrato bruto hidroalcoólico
ELISA	Enzima-imunoenensaio
eNOS/NOS1	Óxido nítrico sintase endotelial

EP2	Receptor de prostaglandina EP2
EP3	Receptor de prostaglandina EP3
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOAc	Acetato de etila
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HCl	Ácido clorídrico
Hex	Hexano
HOCl	Ácido hipocloroso
Hsp27	Proteína de choque térmico 27
ICAM-1	Molécula 1 de adesão intracelular
I.g.	Administração intra-gengival
IKK	Proteína inibitória <i>kappa</i> B quinase
IKK α	Proteína inibitória <i>kappa</i> B quinase <i>alpha</i>
IKK β	Proteína inibitória <i>kappa</i> B quinase <i>beta</i>
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Inerleucina 1 <i>beta</i>
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS/NOS2	Óxido nítrico sintase induzida
I.p.	Administração intra-peritonêal
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon
I.pl.	Administração intra-pleural
IRF3	Fator regulador de interferon 3
I.v.	Administração intra-venosa
I κ B α	Subunidade inibitória do NF- κ B
JNK	Quinase <i>c-Jun N-terminal kinases</i>
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
LAPI	Laboratório de pesquisa em imunologia
LPS	Lipopolissacarídeo
LSP-1	Proteína específica de linfócitos 1
MAPK	Proteína quinase induzida por mitógeno
MAPKK	Proteína quinase dupla induzida por mitógeno
MAPKK3	Proteína quinase dupla induzida por mitógeno 3
MAPKK6	Proteína quinase dupla induzida por mitógeno 6

MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MDP	Adenosina difosfato
MEF-2	Fator otimizador de miócitos 2
MeOH	Metanol
MNK1	Quinase interativa com MAPKs
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	Fosfato dissódico duodecahidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	Fosfato monossódico hidratado
NaOH	Hidróxido de sódio
NET	Armadilha extracelular de neutrófilos
NF-κB	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NLR	Receptor do tipo NOD-like
nNOS/NOS3	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
NO _x	Metabólitos do óxido nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OMS	Organização mundial da saúde
OVA	Ovalbumina
<i>P. sabulosa</i>	<i>Polygala sabulosa</i> A.W. Bennett
p100	Subunidade (p100) do fator nuclear NF-κB
p105	Subunidade (p105) do fator nuclear NF-κB
p38	Quinase p38 (MAPK)
p50	Subunidade (p50) do fator nuclear NF-κB
p52	Subunidade (p52) do fator nuclear NF-κB
p65	Subunidade (p65) do fator nuclear NF-κB
PAMPs	Constituintes moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato/salina
PC	7-preniloxi-6-metoxicumarina
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinase
PLA2	Fosfolipase A2
PRRs	Receptores reconhecedores de padrões

RANKL	Ligante de receptor de NF- κ B
RAW 164.7	Linhagem celular murina
RAW 264.7	Linhagem celular murina
Rel-A	Subunidade (Rel-A) do fator nuclear NF- κ B
Rel-B	Subunidade (Rel-B) do fator nuclear NF- κ B
RLR	Receptor RIG-I-Like
RMN H^1/C^{13}	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
RT-qPCR	Reação da cadeia da polimerase em tempo real
S	Salina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
SRF	Fator de resposta sérica
TGF- β	Fator transformante de colônias <i>beta</i>
TLR	Receptor do tipo Toll-like
TLR-4	Receptor do tipo Toll-like 4
TNFSF3	Linfotoxina <i>beta</i>
TNF- α	Fator necrose tumoral <i>alpha</i>
TTP	Tristetraprolina
VCAM-1	Molécula 1 de adesão de célula vascular
VCl ₃	Cloreto de vanádio
ZnSO ₄	Sulfato de zinco

SUMÁRIO

1. Introdução	23
2. Revisão Bibliográfica	25
2.1. Plantas medicinais	25
2.2. Gênero <i>Polygala</i>	26
2.3. Processo Inflamatório	28
2.4. Resposta Imune Inata	28
2.5. Mediadores inflamatórios	31
2.5.1. Mieloperoxidase (MPO)	31
2.5.2. Adenosina Deaminase (ADA)	33
2.5.3. Óxido nítrico (NO).....	36
2.5.4. Citocinas pró-inflamatórias.....	37
2.6. Rotas de sinalização intracelular envolvidas no processo inflamatório	39
2.6.1. Fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B).....	39
2.6.2. Proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK).....	41
2.7. Modelos de inflamação das vias aéreas	44
3. Objetivos	49
3.1. Objetivo Geral	49
3.2. Objetivos específicos.....	49
4. Materiais e Métodos	51
4.1. Coleta do material vegetal	51
4.2. Obtenção do extrato, frações e composto isolado	51
4.3. Perfil cromatográfico e quantificação do composto majoritário por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)	52
4.4. Animais	53
4.5. Protocolo experimental.....	53
4.6. Contagem total e diferencial de leucócitos.....	59
4.7. Determinação da exsudação	59
4.8. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	60
4.9. Determinação da atividade da adenosina-deaminase (ADA)	60
4.10. Determinação das concentrações de nitrito e nitrato (NO _x).....	61

4.11. Determinação das concentrações das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β).....	61
4.12. Determinação da expressão do mRNA para as citocinas pró inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e para enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS).....	62
4.12.1. Extração e quantificação do RNA	62
4.12.2. Reação de transcrição reversa (RT).....	63
4.12.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).....	63
4.13. Determinação da fosforilação da proteína p65 (NF- κ B) e p38 (MAPK)	64
4.13.1. Dosagem de proteínas totais	64
4.13.2. Quantificação da proteína p65 fosforilada.....	65
4.13.3. Quantificação da proteína p38 total e fosforilada.....	65
4.14. Fármacos e reagentes	66
4.15. Análise estatística.....	67
5. Resultados	69
5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) do extrato bruto hidroalcoólico da <i>Polygala sabulosa</i>	69
5.2. Efeito da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a migração leucocitária e exsudação.....	70
5.3. Efeito da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	76
5.4. Efeito da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a atividade da enzima adenosina-desaminase (ADA).....	77
5.5. Efeito da <i>Polygala sabulosa</i> sobre as concentrações de nitrato e nitrito (NO _x).....	78
5.6. Efeito da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a concentração de fator necrose tumoral alfa (TNF- α)	79
5.7. Efeito da <i>Polygala sabulosa</i> sobre a concentração de interleucina 1-beta (IL-1 β).....	80
5.8. Efeito do composto isolado da <i>Polygala sabulosa</i> , 7-preniloxi-6-metoxicumarina, sobre a expressão de mRNA de TNF- α , IL-1 β e iNOS	81
5.9. Efeito do composto isolado da <i>Polygala sabulosa</i> , 7-preniloxi-6-metoxicumarina, sobre a fosforilação da proteína p65 (NF- κ B).....	83

5.10. Efeito do composto isolado da <i>Polygala sabulosa</i> , 7-preniloxi-6-metoxicumarina, sobre a fosforilação da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK).....	84
6. Discussão	87
7. Conclusão	97
Referencias	99
APÊNDICE	119
ANEXO I	121
ANEXO II	123
ANEXO III	125

1. Introdução

A utilização de produtos naturais e seus derivados por diferentes culturas em todo mundo como agentes terapêuticos para o tratamento das mais diversas doenças é tão antigo quanto a humanidade. Existem relatos de sua utilização, por povos residentes onde hoje localiza-se o território chinês, há mais de 2500 A.C. (PETROVSKA, 2012). Mas é nos dias atuais, com o envelhecimento da população, o alto custo apresentado por fármacos sintéticos e seus efeitos adversos, que os produtos naturais vêm se tornando uma grande fonte de pesquisas de novas substâncias com potencial atividade terapêutica (KOEHN; CARTER, 2005; PETRONILHO et al., 2012). Um exemplo é a pesquisa de fármacos com atividade anticâncer, que de 1940 até 2010, das 175 moléculas desenvolvidas pela indústria farmacêutica, 74,8% não são sintéticas e destas, aproximadamente 50%, são diretamente produtos naturais ou derivadas deles. Além disso, somente em 2010 metade das 20 novas moléculas aprovadas para uso humano eram derivadas de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012). Somente entre os anos de 2001 a 2010, 16 novas substâncias oriundas de produtos naturais foram aprovadas para uso clínico pelo órgão *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América (EUA) (KINGHORN et al., 2011).

Neste cenário o Brasil é mundialmente conhecido por abrigar em suas terras uma biodiversidade extremamente rica. É estimado que o território nacional conte com aproximadamente 20% de todas as espécies vivas conhecidas no mundo, sendo estas espécies distribuídas em diferentes biomas espalhados pelo país, tais como a região da mata amazônica, a mata atlântica, entre outras (BOLZANI; CASTRO-GAMBOA; SILVA, 2010). Existem no país atualmente diversos grupos de pesquisa com foco na pesquisa de produtos naturais e suas atividades terapêuticas, porém, com a incrível quantidade de fontes a serem pesquisadas oferecidas pelo ecossistema nacional ainda existem incontáveis espécies de seres vivos a serem estudados em busca das mais diversas atividades biológicas. Desta forma, o investimento na pesquisa de produtos naturais no Brasil é de extrema importância para que um dos principais patrimônios do país, a biodiversidade, seja utilizado de forma racional a favor da população. Seja na pesquisa de novos compostos com atividade terapêutica ou através da pesquisa etnofarmacológica no sentido de validar efeitos descritos por comunidades regionais, a pesquisa de

produtos naturais é parte importante da ciência brasileira e deve ser explorada com mais afinco e seriedade.

Nos últimos dez anos as espécies do gênero *Polygala* vem despertando interesse em pesquisadores do mundo todo. Diversas espécies deste gênero já possuem efeitos biológicos comprovados, e, em nossa região, a *Polygala sabulosa* A.W. Bennet vem sendo alvo de pesquisas por suas possíveis ações terapêuticas. Embora BORGES et al. (2014) já tenha descrito sua ação anti-inflamatória em modelo de peritonite induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos, esta espécie nunca foi testada em modelo inflamatório pulmonar e tampouco seu composto majoritário, 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC) (BORGES et al., 2014).

Assim, neste estudo optou-se por utilizar o modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos para avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico e frações da *P. sabulosa*, assim como seu composto majoritário. Além disso, o presente estudo ainda visou propor o possível mecanismo de ação do composto majoritário desta espécie, através da avaliação da sua capacidade em inibir cascatas de sinalização intracelulares responsáveis pelo desenvolvimento do processo inflamatório deflagrado pela carragenina.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Plantas medicinais

O uso de plantas com propósito medicinal é tão antigo quanto a humanidade em si. Diversos relatos históricos podem ser citados no que diz respeito ao uso de plantas para cura: o livro chinês *Pen T'Sao* de raízes e plantas escrito pelo imperador Shen Nung por volta de 2500 A.C., os *Vedas* sagrados indianos que datam por volta de 2000 A.C. citam várias plantas para tratamento de enfermidades, no Egito o papiro *Ebers* que é um tratado de medicina de 1500 A.C. onde 700 plantas são citadas com propriedades curativas, entre diversos outros (PETROVSKA, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as plantas medicinais, ou ervas medicinais como o próprio órgão prefere citar, são um subgrupo de terapias baseadas no conhecimento, prática e experiência popular conhecido como medicina tradicional e complementar. A OMS ainda diz que o uso da medicina tradicional e complementar expandiu globalmente tornando-se popular não somente em países que dependem de terapias menos custosas mas também em países onde a medicina convencional é predominante em seu sistema nacional de saúde (OMS, 2000).

É estimado que em países em desenvolvimento 65 a 80% da população dependa de plantas medicinais para cuidados primários de saúde, devido à falta de acesso aos tratamentos geralmente mais custosos da medicina convencional (CALIXTO, 2005). Além disso, a pesquisa de potencial terapêutico em produtos naturais tem sido fonte de lucros para alguns países, como na China, cujos produtos relacionados a medicina tradicional e complementar arrecadou um total de 14 bilhões de dólares em 2005. Em 2007, o Brasil investiu aproximadamente 160 milhões de dólares na produção de produtos obtidos a partir de plantas medicinais, o que é muito aquém dos investimentos de países que destacam-se neste ramo (ROBINSON; ZHANG, 2011).

Dentre os efeitos biológicos presentes nos produtos naturais, o efeito anti-inflamatório ganha destaque, uma vez que ainda hoje existem muitas doenças inflamatórias refratárias aos medicamentos tradicionais e disponíveis no mercado. Diversos compostos com atividade anti-inflamatória já foram isolados de plantas de diferentes espécies, por exemplo: os monoterpenos β -bisabolol e azuleno isolados da *Matricaria recutita*, os triterpenos taraxesterol e lupeol isolados da *Calendula*

officinalis, a lactona sesquiterpênica helenalina isolada da *Arnica montana*, o triterpeno glicirrizina isolado da *Glycyrrhiza glabra*, os triterpenos ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido micromérico isolados da *Rosmarinus officinalis*, a cumarina escopoletina isolada da *Santolina oblongifolia* e o sesquiterpeno α -humuleno isolado da *Cordia verbenaceae* (BLUMENTHAL, 2003; FYLAKTAKIDOU et al., 2004; ALTINIER et al., 2007; FERNANDES et al., 2007). As cumarinas, uma grande classe de metabólitos secundários isolados de plantas medicinais, são compostos derivados fenólicos encontrados em diversas espécies do reino vegetal e consistem de anéis fundidos de benzeno e α -pirona. Diversas atividades biológicas já foram atribuídas a essa classe de compostos que possui mais de 1300 estruturas identificadas (HOULT; PAYA, 1996; FYLAKTAKIDOU et al., 2004). O efeito anti-inflamatório das cumarinas é descrito por inúmeros autores e esta classe de compostos vem se mostrando promissora no que diz respeito a pesquisa de novos fármacos com este propósito (TIMONEN et al., 2011; BANSAL; SETHI; BANSAL, 2013).

Assim, o interesse em medicamentos à base de produtos naturais, somado a preocupação com os efeitos adversos e alto valor agregado a medicamentos sintéticos tem impulsionado pesquisas de produtos naturais com potencial atividade terapêutica baseado no seu uso popular (KOEHN; CARTER, 2005; PETRONILHO et al., 2012).

2.2. Gênero *Polygala*

O gênero *Polygala* compreende cerca de 725 espécies no mundo, sendo 110 destas no Brasil. Este gênero é característico de regiões tropicais e temperadas e no Brasil as suas espécies são facilmente encontradas nos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (PAIVA, 1998; MARQUES; PEIXOTO, 2007).

Estudos pré-clínicos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, comprovaram atividades biológicas deste gênero. Dentre estas atividades vale citar: atividade antiulcerogênicas (KLEIN et al., 2010), antidepressiva (CAPRA et al., 2010), anticonvulsivante, ansiolítica (DUARTE et al., 2008) e até anticâncer (PAUL et al., 2011). Estudos vem demonstrando o potencial efeito anti-inflamatório do gênero, como o desenvolvido por KIM et al. (1998) que demonstrou que o extrato aquoso de *Polygala tenuifolia* inibe a secreção do fator de necrose tumoral *alpha* (TNF- α) em astrócitos murinos (KIM et al., 1998). Recentemente, foi demonstrada a

capacidade do extrato de *Polygala japonica* em reduzir edema de orelha induzido por diversos agentes flogísticos em camundongos (KOU et al., 2006). Além disso, nosso grupo de pesquisa também demonstrou atividade anti-inflamatória deste gênero quando estudou e comprovou a capacidade da *Polygala molluginifolia* de inibir o processo inflamatório no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, mesmo modelo deste trabalho (ARRUDA-SILVA et al., 2014).

Vários estudos vêm caracterizando fitoquimicamente o gênero, sendo os principais metabólitos secundários já descritos os seguintes: xantonas (CHANG et al., 2007), saponinas (WANG et al., 2008), antraquinonas, flavonóides (KIM et al., 2009), cumarinas (MEOTTI et al., 2006) e fenilpropanóides (CHO et al., 2012). A presença de xantonas com importante efeito anti-inflamatório foi evidenciada em modelo *in vitro* de ativação de neutrófilos (ALI et al., 2011). As saponinas, também presente no gênero *Polygala*, possuem efeito anti-inflamatório como relatado no estudo feito por WANG et al. (2008), onde foi demonstrada a significativa redução do edema de pata induzida pela carragenina, tanto em camundongos como em ratos (WANG et al., 2008). Estudos sobre os principais constituintes do gênero demonstraram atividade anti-inflamatória de antraquinonas, sendo estas responsáveis pela inibição da atividade enzimática de ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2) em modelos *in vivo* e *in vitro* (GAUTAM et al., 2010). Os flavonoides possuem comprovada atividade anti-inflamatória inibindo a expressão e a liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios (GONZALEZ-GALLEGO; SANCHEZ-CAMPOS; TUNON, 2007), inclusive quando utilizados no modelo de pleurisia induzida pela carragenina (SOUZA; RAO; SILVEIRA, 1992; ARRUDA-SILVA et al., 2014). Além disso, as cumarinas naturais e seus derivados sintéticos também possuem conhecida atividade anti-inflamatória (FYLAKTAKIDOU et al., 2004).

A espécie *Polygala sabulosa* A.W. Bennet, popularmente conhecida como timutu-pinheirinho, é usada tradicionalmente para o tratamento de afecções dos rins, intestino e pulmões (MARQUES, 1996). Esta espécie é característica da “zona de campos” do planalto catarinense, onde apresenta vasta e expressiva dispersão, sendo mais encontrada nos campos úmidos e beiras de banhados (WURDACK; SMITH, 1971). As atividades biológicas relatadas para esta espécie são: antinociceptiva (RIBAS et al., 2008), anticonvulsivante e ansiolítica (DUARTE et al., 2007), tripanocida (PIZZOLATTI et al., 2008) e, recentemente, BORGES et al. (2014) relataram atividade anti-inflamatória do extrato bruto

hidroalcoólico, fração diclorometano e de um composto isolado desta espécie (α -spinasterol) em modelo de peritonite induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos (BORGES et al., 2014). Embora o efeito anti-inflamatório da planta já seja relatado não foi comprovada a atividade do composto majoritário desta espécie (7-preniloxi-6-metoxicumarina), além de nunca ter sido comprovado que esta espécie apresenta o mesmo perfil de atividade biológica em um modelo *in vivo* de inflamação pulmonar, fato que poderia validar um de seus usos tradicionais.

2.3. Processo Inflamatório

A inflamação é tipicamente vista como uma resposta protetiva localizada em um tecido danificado e/ou frente a uma infecção microbiana, ou ainda outros estímulos, e serve para isolar e destruir agentes lesivos e preparar o tecido danificado para eventual reparação. A importância da inflamação para a homeostase tanto em tecidos lesados como no organismo como um todo é evidenciada pelo fato de que deficiências na resposta inflamatória comprometem o indivíduo, sugerindo que a inflamação é um importante processo fisiológico (GRANGER; SENCHENKOVA, 2010).

O processo inflamatório pode ser caracterizado por alguns pontos-chaves, como: vasodilatação, aumento do fluxo e permeabilidade vascular, formação de exsudato, migração de leucócitos para o local lesionado, formação de espécies reativas de oxigênio, liberação de fatores de crescimento e a geração de um novo tecido funcional (SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Diversas células e mediadores estão envolvidos na resposta inflamatória, e o recrutamento destes para o local da inflamação tem como objetivo reconhecer e eliminar microrganismos e restos celulares.

2.4. Resposta Imune Inata

A resposta imune pode ser definida como a forma que o corpo reconhece e se defende de bactérias, vírus e substâncias lesivas ou que parecem não fazer parte do organismo. Didaticamente podemos dividir a imunidade em imunidade inata e adaptativa. Dentre as diferenças entre as duas podemos citar o fato de a imunidade inata ser não específica a um antígeno, ser uma resposta imediata e sem resultar em memória

imunológica, ao contrário da resposta adaptativa. Desta forma, durante as primeiras horas e dias de exposição a um novo patógeno dependemos da resposta imune inata para proteger o organismo de uma infecção. Vale lembrar que enquanto a imunidade adaptativa surgiu no processo evolutivo a menos de 500 milhões de anos atrás e está confinada apenas aos vertebrados, a resposta imune inata é encontrada em vertebrados, invertebrados e até mesmo em plantas, e os mecanismos básicos que regulam esta resposta são conservados. Além disso, a resposta imune adaptativa é dependente da ativação prévia da resposta imune inata (PARKIN; COHEN, 2001; ALBERTS et al., 2007).

As células da resposta imune inata reconhecem constituintes moleculares associados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Pattern* – PAMPs), que geram e perpetuam uma resposta inflamatória diante de uma infecção, e constituintes moleculares associados a dano (*Damage-Associated Molecular Pattern* – DAMPs) que geram e perpetuam respostas inflamatórias não relacionadas a processos infecciosos. Para que este reconhecimento de agentes lesivos ocorra a ligação entre estes PAMPs e DAMPs com receptores reconhecedores de padrões (*Pattern Recognition Receptors* – PRRs) deve acontecer (FOELL; WITTKOWSKI; ROTH, 2007; TRIANTAFILOU; TRIANTAFILOU, 2012). Dentre os PRRs mais conhecidos atualmente podemos citar: *Toll Like-Receptors* (TLRs), *RIG-I-Like Receptors* (RLRs), *NOD-Like Receptors* (NLRs) e os *AIM2-Like Receptors* (ALRs). Estes são receptores que podem ser encontrados tanto na membrana quanto no citosol da célula e são capazes de ativar vias de sinalização responsáveis por expressar mediadores inflamatórios (HAYASHI; NAKAMURA; TAKAOKA, 2011).

Os PRRs, em especial os TLRs, vêm recebendo grande atenção nos últimos anos por serem alvos terapêuticos em potencial para modulação do processo inflamatório. Os TLR-4, por exemplo, são responsáveis por ativar fatores de transcrição importantes como o fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) e fator regulador de interferon (IRF3), além das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) p38, ERK e JNK (DONG et al., 2006; HANCOCK; NIJNIK; PHILPOTT, 2012). Estes receptores são comumente ativados na presença de lipopolissacarídeo (LPS) mas sua ativação por carragenina também já foi relatada (BHATTACHARYYA; DUDEJA; TOBACMAN, 2008).

Dentre as células envolvidas na imunidade inata podemos citar as células mononucleares: monócitos/macrófagos, mastócitos, células *natural killer*, células dendríticas e as células polimorfonucleares, com

destaque para os neutrófilos. Os neutrófilos são gerados na medula óssea de forma incessante a partir de células precursoras mielóides. Sua produção pode alcançar contagens acima de 2×10^{11} na corrente sanguínea e, durante a inflamação, o número de neutrófilos é consideravelmente aumentado nos tecidos lesionados, o que comprova sua migração a partir dos vasos em direção ao estímulo lesivo. Em condições fisiológicas estas células entram em apoptose após a manutenção do tecido e são removidas por macrófagos e células dendríticas. Estas células são a linha de frente no que diz respeito a defesa do organismo, são consideradas células potentes do sistema imune e frequentemente são associadas a danos teciduais causados por respostas exageradas (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Porém, os neutrófilos não são as únicas células envolvidas no processo inflamatório. De fato estas são as primeiras células a chegarem no sítio da lesão para contenção e remoção de partículas infecciosas, mas além disso também são responsáveis por prover sinais para outras células do sistema imune inato sobre uma ameaça. Além do ataque direto de patógenos através da fagocitose, liberação de enzimas e formação de espécies reativas de oxigênio, estas células ainda são capazes de formar armadilhas extracelulares compostas de DNA nuclear, proteínas e enzimas que imobilizam o patógeno facilitam sua fagocitose (MANTOVANI et al., 2011). Desta forma seria mais correto associar estas células a franco atiradores do sistema imune contra patógenos. Ao invés disto, estas células são vistas como soldados rudes e não refinados cuja missão bem-sucedida é frequentemente associada com dano tecidual colateral (NATHAN, 2006).

A chegada de neutrófilos ao local da inflamação e o reconhecimento do estímulo lesivo acaba por promover o recrutamento de monócitos. Estas células se diferenciam em macrófagos no tecido e são as principais células do sistema fagocítico mononuclear. No processo inflamatório os macrófagos têm três principais funções: apresentação de antígeno, fagocitose e imunomodulação através da produção de citocinas e fatores de crescimento, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) além de sua atividade catabólica e proteolítica. Estes mononucleares são ativados e desativados na inflamação. Sinais de ativação incluem citocinas pró-inflamatórias, LPS, proteínas da matriz extracelular de bactérias e outros mediadores químicos. Após remoção do agente causador da inflamação, estas mesmas células podem ser desativadas através de citocinas anti-inflamatórias e citocinas antagonistas que são normalmente produzidas pelo próprio macrófago ou por células também envolvidos no processo (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; POLLARD,

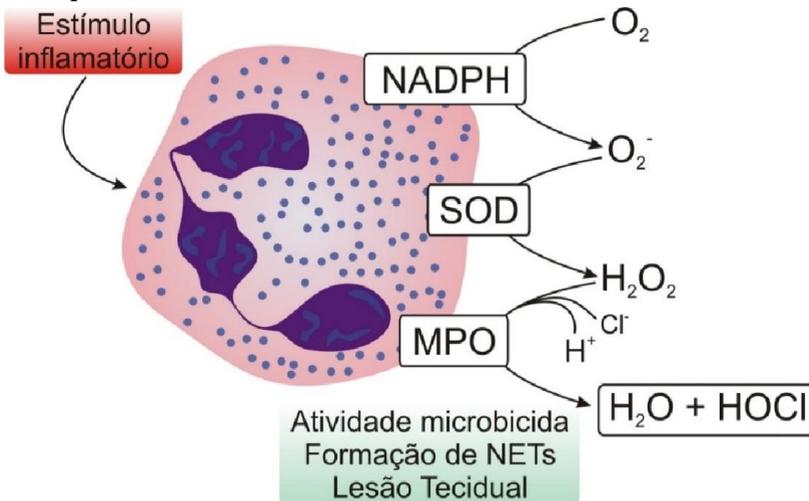
2009; GALLI; BORREGAARD; WYNN, 2011). Além da imunidade inata, os macrófagos ainda desempenham importante atividade na imunidade adaptativa, em ambas as imunidades essas atividades são mediadas pela expressão de uma grande variedade de receptores, incluindo nestes o TLRs e NLRs além de modularem a formação do inflamassoma um complexo multiproteico intracelular que atua na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (CASPASES) como uma estrutura essencial para a regulação da imunidade em condições fisiológicas e no reconhecimento de sinais de perigo a diferentes componentes (MOSSER; EDWARDS, 2008).

2.5. Mediadores inflamatórios

2.5.1. Mieloperoxidase (MPO)

A enzima mieloperoxidase é uma das proteínas mais abundantes em neutrófilos, representando cerca de 5% de seu peso seco. Esta enzima catalisa a oxidação de cloreto na presença de peróxido de hidrogênio para gerar ácido hipocloroso e outros produtos altamente reativos que mediam ação antimicrobiana. Além disso, sabe-se que esta enzima está envolvida no processo de formação das armadilhas extracelulares dos neutrófilos (*Neutrophil Extracellular Traps* – NETs) (METZLER et al., 2011). O processo para produção de EROs ocorre durante a fagocitose com a ativação do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxigenase (NADPH). A NADPH oxidase é responsável por reduzir o oxigênio molecular (O_2) ao radical ânion superóxido (O_2^-) que, por sua vez, é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 é responsável por destruir as bactérias diretamente, ou através de sua conversão em íons hidroxila ou ácido hipocloroso (HOCl) (**Figura 1**) (KLEBANOFF, 2005).

Figura 1. Formação de agentes oxidantes pela enzima mieloperoxidase



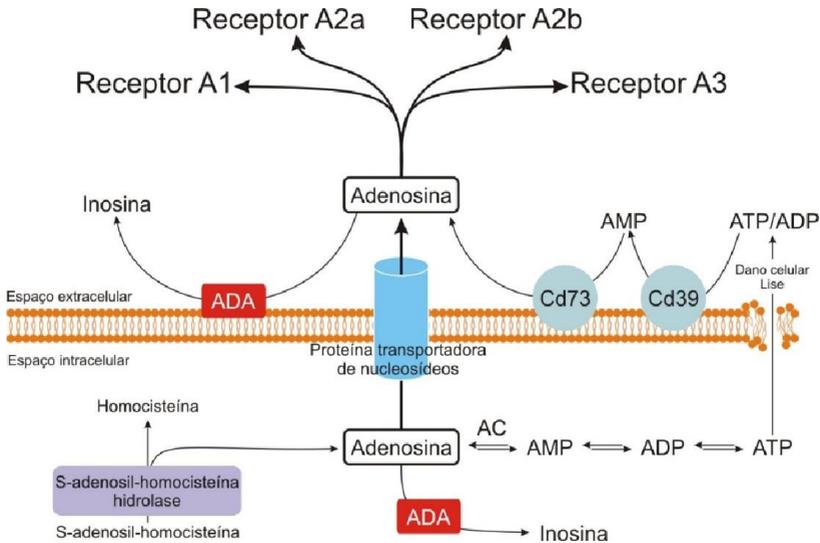
A NADPH oxidase e a SOD são responsáveis pela formação de peróxido de hidrogênio, o qual é convertido em ácido hipocloroso pela enzima MPO e tem importante ação microbicida e na resposta imune inata. Cl⁻: cloreto; H⁺: hidrônio; H₂O: água; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; HOCl: ácido hipocloroso; MPO: mieloperoxidase; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxigenase; O₂⁻: ânion superóxido; O₂: oxigênio molecular; SOD: superóxido dismutase. Fonte: Elaborada pelo autor, adaptado de KLEBANOFF (2005).

Embora a formação de agentes oxidantes pela MPO seja benéfica em termos de resposta imune quando uma infecção ocorre, existem evidências consideráveis de que o estímulo inapropriado desta enzima pode resultar em dano tecidual. Desta forma o dano a células e tecidos no local onde o processo inflamatório se desenvolve é acentuado. Este dano vem sendo relacionado com diversas patologias pulmonares (asma e fibrose císticas), neurodegenerativas (mal de Alzheimer, mal de Parkinson e esclerose múltipla), reumáticas (artrite reumatoide) entre outras, e, pelo menos em alguns casos, evidências experimentais e epidemiológicas estão disponíveis para sugerir que a geração de agentes oxidantes pela MPO é parte da causa (DAVIES, 2011).

2.5.2. Adenosina Deaminase (ADA)

A enzima adenosina deaminase é a principal responsável pelo processo de desaminação da adenosina em inosina. Em condições basais, níveis em escala nanomolar de adenosina podem ser detectados no espaço extracelular (30-200 nM). As concentrações de adenosina podem aumentar, dependendo da demanda do tecido sofrendo o estresse metabólico (inflamação, isquemia, etc) através de dois mecanismos: formação intracelular deste nucleosídeo e sua exportação para o espaço extracelular via transportador de nucleosídeos ou degradação extracelular de nucleotídeos adenina (ATP e/ou ADP) liberados por diversas células. A geração de adenosina intracelular também é regulada pela enzima citoplasmática S-adenosil-homocisteína hidrolase, que converte S-adenosil-homocisteína em adenosina. Uma vez no exterior da célula a enzima ADA pode converter a adenosina em inosina. No interior da célula a adenosina também pode ser convertida em inosina pela ADA ou ser metabolizada novamente em AMP através da adenosina quinase (**Figura 2**) (ANTONIOLI et al., 2014).

Figura 2. Vias metabólicas da formação de adenosina



A adenosina pode ser sintetizada de forma intracelular e ser exportada para o espaço extracelular via transportador de nucleosídeos ou degradação extracelular de nucleotídeos adenina (ATP e/ou ADP) liberados por diversas células. A enzima ADA é responsável por metabolizar a adenosina tanto extracelular quanto intracelular em inosina. AC: adenosina quinase; ADA: adenosina deaminase; ADP: adenosina difosfato; AMP: adenosina monofosfato; ATP: adenosina trifosfato; Cd39: nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase; Cd73: 5'-nucleotidase. Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de ANTONIOLI et al. (2014).

A adenosina extracelular age como uma moduladora da proteção celular tanto em condições fisiológicas quanto em patofisiológicas. Essa resposta protetiva pode se dar em forma de aumento do fluxo sanguíneo (vasodilatação ou angiogênese), pré-condicionamento isquêmico (no coração, cérebro ou musculatura esquelética) e/ou supressão da inflamação (JACOBSON, 2009). Para que isto ocorra a adenosina se liga a receptores específicos que se diferenciam de acordo com sua afinidade, pela expressão nos tecidos e pelas vias de sinalização que são ativadas por este autacóide, os receptores são A1, A2a, A2b e A3 e estão presentes em diferentes células, incluindo do sistema imune inato e vias aéreas (FREDHOLM et al., 2011).

A ação da adenosina nos seus receptores parece diferir quanto a atividade anti-inflamatória e pró-inflamatória dependendo da célula em que age, sua concentração, densidade de receptores na membrana celular e funcionalidade das vias de sinalização acopladas aos receptores. Em neutrófilos, por exemplo, quando a adenosina se liga em receptores A2a, A2b e A3 há uma diminuição da adesão destes leucócitos a células do endotélio assim como a diminuição da produção de ânions superóxidos, tendo então atividade anti-inflamatória. Já ao se ligar a receptores do tipo A1 nesta célula um aumento na expressão de moléculas de adesão ocorre, sendo esta uma resposta pró-inflamatória. Curiosamente, ao se ligar em receptores do tipo A2b e A3 em mastócitos ocorre o aumento de liberação de histamina por parte desta célula, além do aumento da expressão de IL-1 β e IL-8, configurando também uma resposta pró-inflamatória (KUMAR; SHARMA, 2009).

O aumento no interesse no papel da ADA surgiu de evidências apontando que o defeito congênito nesta enzima representa a causa principal na função prejudicada de células T e B. Desde a observação destes fatos, diversas pesquisas já apontaram o importante papel desta enzima em células do sistema imune incluindo macrófagos e neutrófilos. Em macrófagos, por exemplo, a ADA é apontada como pivô na maturação e diferenciação de monócitos para macrófagos (HASKO et al., 1996), além de um aumento na atividade desta enzima ser relatada em macrófagos estimulados (FISCHER et al., 1976) e existir uma correlação entre a produção de superóxido e atividade de ADA intracelular durante a fagocitose (TRITSCH; NISWANDER, 1981). Já em neutrófilos é relatado que o aumento da atividade ou expressão da ADA tende a facilitar a resposta destas células a estímulos quimiotáticos além de otimizar da liberação EROs (CRONSTEIN et al., 1985; KALVEGREN; FRIDFELDT; BENGTSSON, 2010).

Neste contexto, a indução da ADA representa um ponto chave para regular as concentrações de adenosina extracelular e, conseqüentemente, modular o estímulo de receptores de adenosina. Desta forma, a ADA tem um papel de suma importância em controlar a magnitude da resposta purinérgica tanto em condições fisiológicas quanto na presença de eventos patológicos. Levando estes fatos em consideração, atualmente diversas pesquisas têm sido direcionadas para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios tendo como mecanismo a ação inibitória sobre esta enzima catabólica (ANTONIOLI et al., 2012).

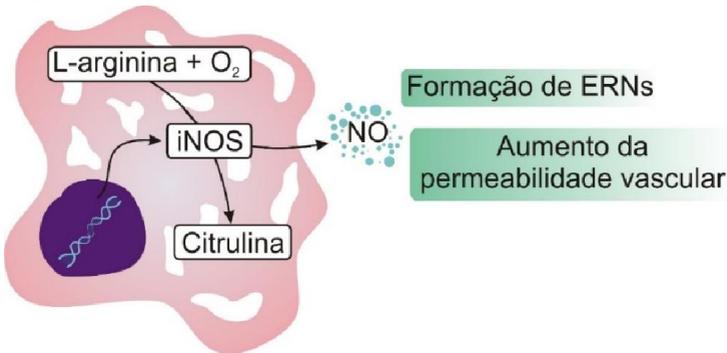
Vale lembrar que a atividade desta enzima já é utilizada na clínica como marcador sorológico para auxílio diagnóstico na tuberculose

humana além de também estar aumentada em pacientes com asma (SUN et al., 2005; HASKO et al., 2008; VERMA et al., 2008; AFRASIABIAN et al., 2013).

2.5.3. Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico, um gás solúvel, é um importante mediador da resposta inflamatória. Esta molécula é liberada principalmente por células endoteliais e por macrófagos e participa de inúmeros processos fisiológicos de extrema importância para a homeostase do organismo como a regulação do tônus muscular, do processo inflamatório, da neurotransmissão e da apoptose (NAGY et al., 2007; TRIPATHI et al., 2007). Para que este gás seja formado, o aminoácido essencial *L*-arginina é oxidado formando *L*-citrulina e óxido nítrico. Esta reação química é catalisada por um grupo de enzimas chamadas de óxido nítrico sintase (NOS) e ajuda de alguns cofatores. Existem três isoformas destas enzimas, sendo elas a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS1), a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS3) e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS2), sendo que as três podem ser encontradas no tecido pulmonar (**Figura 3**) (GHOSH; ERZURUM, 2011).

Figura 3. Formação e efeitos do óxido nítrico na inflamação



O aminoácido essencial *L*-arginina é oxidado pela enzima iNOS durante o processo inflamatório para formar *L*-citrulina e óxido nítrico. O NO favorece o influxo de leucócitos para local da inflamação, formação de edema e gera ERNs. ERNs: espécies reativas de nitrogênio; iNOS: óxido nítrico sintase induzida; NO: óxido nítrico; O₂: oxigênio molecular. Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de GHOSH e ERZURUM (2011).

A iNOS, diferente das outras duas isoformas da enzima que são constitutivas, pode ser produzida através de estímulo inflamatório como a presença de TNF- α ou interleucina 1 *beta* (IL-1 β) no sítio da lesão. A indução desta enzima acarreta em aumento da permeabilidade vascular devido ao aumento de NO, a formação de edema e a infiltração de células inflamatórias também são resultado desta indução (POBER; SESSA, 2007). Além disso, a iNOS é indiretamente responsável por catalisar a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) através do aumento de NO no local do processo inflamatório. Estes metabólitos são capazes de causar lesão ao DNA, lipídeos microbianos e células saudáveis, sendo este mecanismo presente na inflamação em doenças autoimunes (RICCIARDOLO et al., 2004; MENEGAZZI et al., 2006). O envolvimento desta enzima no processo inflamatório já é bem descrito e hoje a sua inibição está sendo também alvo para o desenvolvimento de novos fármacos com objetivo de reduzir a produção de óxido nítrico durante o processo inflamatório (BOTTA et al., 2008).

2.5.4. Citocinas pró-inflamatórias

As citocinas afetam praticamente todos os processos biológicos no organismo, como por exemplo: desenvolvimento embrionário, patogênese de uma doença, respostas não específicas a uma determinada infecção, respostas específicas a antígenos, mudanças nas funções cognitivas e a progressão do processo degenerativo no envelhecimento. Podem ser divididas em classes funcionais, algumas são fatores de crescimento de linfócitos, outras funcionam como pró-inflamatórias e outras ainda como anti-inflamatórias (DINARELLO, 2007). Além disso, as citocinas podem ser secretadas por todas as células da resposta imune e entre as principais secretadas por células fagocíticas ativadas estão o TNF- α e a IL-1 β (MANDERSCHIED et al., 2004).

O TNF- α é liberado por células do sistema imune porém, macrófagos ativados e linfócitos T tendem a ser as células com maior liberação desta citocina. Em condições normais o TNF não é detectável no organismo, mas encontra-se elevado em indivíduos com algum processo inflamatório e/ou infeccioso instalado. Esta citocina tem a capacidade de induzir a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos (E-selectina, molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula 1 de adesão da célula vascular (VCAM-1)). Em combinação com a liberação de quimiocinas (interleucina 8 (IL-8), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e proteína 10 induzida pelo interferon (IP-10)) essas respostas

levam ao recrutamento de diferentes populações leucocitárias (BRADLEY, 2008). Além do disso, o TNF- α é capaz de induzir a ativação da via de sinalização do NF- κ B (BRADLEY, 2008). Ainda, a ativação da via das MAPKs, do NF- κ B e da fosfatidil-inositol quinase 3 (PI3K) por esta citocina apresenta atividade antiapoptótica em neutrófilos. Como consequência deste processo há um aumento do tempo de vida útil destes leucócitos podendo agravar a lesão tecidual causada pela inflamação (COWBURN et al., 2004; KILPATRICK et al., 2006). Estudos já demonstraram o envolvimento desta citocina em diversas doenças de caráter inflamatório, dentre elas o diabetes (UNO et al., 2007), a aterosclerose (ZHANG et al., 2007), a artrite reumatoide (TOUSSIROT; WENDLING, 2007) e a psoríase (TOBIN; KIRBY, 2005).

A IL-1 β é outra citocina com importante efeito tanto na inflamação aguda quanto crônica, além de doenças autoimunes. Esta citocina possui importante função para o homeostase do organismo como na regulação da alimentação, do sono e temperatura corporal. Entretanto, a produção exacerbada de IL-1 β está relacionada a mudanças fisiopatológicas que ocorrem em diferentes doenças, como a artrite reumatoide, dor neuropática, osteoartrite, esclerose múltipla e doença de Alzheimer. A IL-1 β pode ser liberada por queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, neuronais e inclusive células do sistema imune como mastócitos e macrófagos (REN; TORRES, 2009). Além de promover o recrutamento de células inflamatórias para o local da inflamação pela indução da expressão de moléculas de adesão, esta citocina ainda induz a produção de diversas enzimas como a fosfolipase A2 (PLA2), ciclooxigenase 2 (COX-2) e iNOS. Como consequência da produção destes mediadores temos a produção de prostaglandina E2 (PGE2) e NO, que por sua vez, contribuem para respostas locais e sistêmicas (GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010).

Assim como o TNF- α , a IL-1 β tem a capacidade de induzir a atividade do NF- κ B. Porém, ao contrário do TNF- α a ativação deste fator de transcrição pela IL-1 β é independente da presença de Proteína inibitória *kappa* B quinase beta (IKK β). Desta forma, fármacos que tem como alvo principal a inibição da IKK β não seriam eficazes em doenças inflamatórias onde a IL-1 β tem papel central (SOLT et al., 2007). Ademais, a indução da expressão da molécula de adesão ICAM-1 pela IL-1 β é, pelo menos em parte, dependente da cascata de sinalização das MAPKs e NF- κ B em células do trato respiratório (LIN et al., 2005). Além disso, tanto o TNF- α como a IL-1 β são estimuladores da produção e liberação de IL-8, uma quimiocina de suma importância para quimiotaxia

neutrófila (SPEYER et al., 2004; HIETBRINK et al., 2006). Desta forma, fármacos que produzam uma redução na síntese ou na liberação da IL-1 β podem apresentar resultados promissores no tratamento de doenças inflamatórias onde esta citocina apresenta papel de destaque.

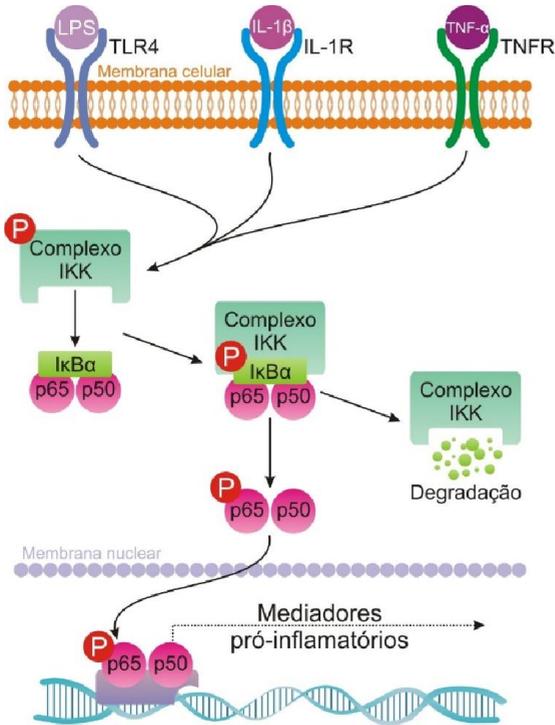
2.6. Rotas de sinalização intracelular envolvidas no processo inflamatório

2.6.1. Fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B)

Os fatores de transcrição NF- κ B são reguladores da resposta imune, resposta a estresse, apoptose e diferenciação celular. Uma grande variedade de ativações depende do estímulo destes fatores de transcrição, que por sua vez é capaz de mediar uma grande variedade de programas transcripcionais. Em mamíferos existem cinco membros da família do NF- κ B: RelA (p65), RelB e c-Rel, e as proteínas precursoras NF- κ B1 (p105) e NF- κ B2 (p100), que são processadas em p50 e p52, respectivamente (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011).

Nos últimos anos ficou claro que existe pelo menos duas rotas de sinalização para o NF- κ B: a via canônica (**Figura 4**), ativada por produtos microbianos e citocinas pró-inflamatórias levando a ativação de complexos contendo RelA (p65), e a via não canônica, ativada por citocinas da família do TNF (mas não o TNF- α) como a linfotóxina β (TNFSF3), o ligante CD40 (CD40L), o fator ativador de células B (BAFF) e ligante de receptor ativador de NF- κ B (RANKL), que resultam na ativação de complexos contendo RelB (LAWRENCE, 2009).

Figura 4. Via de ativação canônica do NF- κ B



No processo inflamatório, a via de sinalização do NF- κ B é ativada por diferentes receptores, entre estes estão receptores de IL-1, TNF- α e o TLR4. Durante o processo de ativação o complexo proteico IKK é ativado e fosforila a proteína inibitória I κ B α , que por sua vez será degradada deixando de exercer suas funções sobre as subunidades p65 e p50 do NF- κ B. Uma vez ativado e fosforilado o dímero p65/p50 se transloca para o núcleo celular realizando a transcrição nuclear de genes responsáveis por produzir citocinas pró-inflamatórias entre outros mediadores. IKK: proteína inibitória *kappa* B quinase; I κ B α : subunidade inibitória do fator de transcrição nuclear NF- κ B; IL-1 β : interleucina 1 β ; IL-1R: receptor de interleucina 1; LPS: lipopolissacarídeo; TLR4: receptor do tipo *Toll-like* 4; TNF- α : fator necrose tumoral *alpha*; TNFR: receptor de fator necrose tumoral. Fonte: Elaborado pela autor, adaptado de VIATOUR et al. (2005).

Os complexos ativados por esta via de sinalização se apresentam na forma de hetero ou homodímeros, sendo o heterodímero p65/p50 o

mais abundante na grande maioria das células. Quando associado a proteína inibidora subunidade inibitória do fator de transcrição nuclear NF- κ B (I κ B α) o heterodímero p65/p50 matem-se inativo no citoplasma. É através da degradação da I κ B α mediado pelo complexo IKK e a fosforilação da subunidade p65 que o NF- κ B passa a causar suas atividades regulatórias na inflamação como expressão de citocinas pró-inflamatórias (VIATOUR et al., 2005; JANSSENS; TSCHOPP, 2006).

Atualmente a disfunção na via de sinalização do NF- κ B está associada a diversos processos patológicos, entre estes podemos citar o desenvolvimento de tumores, colite ulcerativa, doença de Crohn, artrite reumatoide, lúpus eritematoso, entre outros (SUN; ZHANG, 2007). Devido a essa importante participação no desenvolvimento de doenças cujo processo inflamatório está presente, o NF- κ B vem sendo o cerne de diversas pesquisas para o desenvolvimento de fármacos com potencial atividade anti-inflamatória (CALZADO; BACHER; SCHMITZ, 2007; LAWRENCE, 2009; VON BISMARCK et al., 2009).

2.6.2. Proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK)

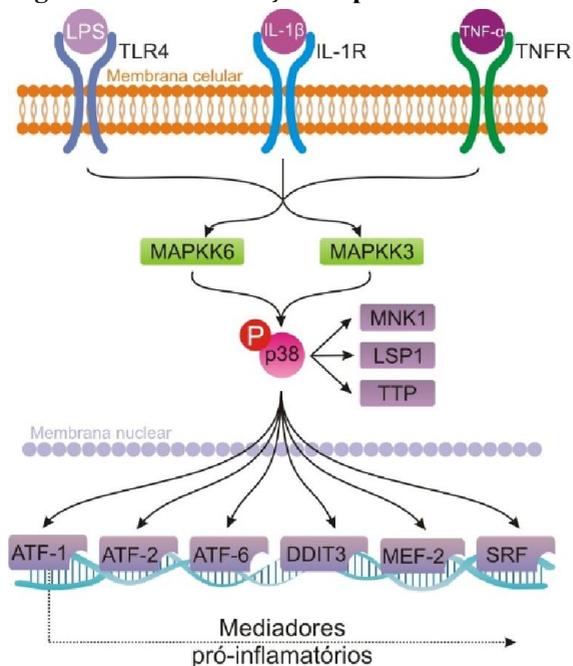
As cascatas de sinalizações dependentes de proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK) estão presentes praticamente em todas as células eucarióticas como reguladoras de processos tanto fisiológicos quanto patológicos. As diferentes MAPKs presentes nas células respondem a diferentes estímulos. Estes estímulos incluem hormônios, fatores de crescimento, citocinas, PAMPs, DAMPs e estresse metabólico. Desta forma as MAPKs são responsáveis por processos de recrutamento de fatores de transcrição, biossíntese de proteínas, controle de ciclo celular, apoptose e diferenciação (KYRIAKIS; AVRUCH, 2012).

A MAPK p38 tem um papel central em respostas inflamatórias regulando múltiplas cascatas de sinalização e está amplamente expressa em diferentes células, incluindo células do sistema imunológico. Diferentes estímulos são capazes de ativar a p38, dentre estes o estresse, endotoxinas, citocinas e até mesmo fumaça de cigarro. Uma vez ativada, esta MAPK fosforila substratos para iniciar a síntese de uma grande variedade de mediadores pro-inflamatórios dentre estes o TNF- α , a IL- β e a iNOS (JEON et al., 2000; SCHIEVEN, 2005). A p38 é capaz de regular a expressão gênica através de quatro diferentes mecanismos: fosforilação direta de fatores de transcrição (SAKLATVALA, 2004), regulação da estabilidade no mRNA (KUMAR; BOEHM; LEE, 2003),

regulação de proteínas responsáveis pela tradução do mRNA (SAKLATVALA, 2004), regulação da ligação do NF- κ B com genes a serem transcritos (SACCANI; PANTANO; NATOLI, 2002; SOLOAGA et al., 2003).

Assim como todas as MAPKs, a p38 pode ser ativada intracelularmente, após estímulo de receptores, por duas diferentes MAP quinase quinase (MAPKK). As duas MAPKKs geralmente responsáveis pela ativação da p38 são MAPKK3 e a MAPKK6, embora outras quinases possam ativar a p38. Após sua fosforilação a p38 é capaz de induzir fatores de transcrição e proteínas intracelulares como ATF-1/2/6, SRF, MEF-2, DDIT3, LSP1, TTP e MNK1 sendo estes envolvidos no processo inflamatório através regulação da liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Interleucina 6), indução de enzimas pro-inflamatórias como a COX-2 e iNOS, aumento na expressão de moléculas de adesão em neutrófilos além de manterem a estabilidade do mRNA de citocinas pró-inflamatórias e regularem a sua tradução (**Figura 5**) (ZARUBIN; HAN, 2005).

Figura 5. Via de ativação da p38 MAPK



No processo inflamatório, a via de sinalização da p38 MAPK é ativada por diferentes receptores, entre estes estão receptores de IL-1, TNF- α e TLR4. As MAPKK3 e a MAPKK6 fosforilam a p38, embora outras quinases possam também ativar a p38. Após sua fosforilação a p38 induz diferentes fatores de transcrição como ATF-1/2/6, SRF, DDIT3 e MEF-2, fatores responsáveis pela liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-6, indução de enzimas pró-inflamatórias como a COX-2 e iNOS, e aumento na expressão de moléculas de adesão em neutrófilos. ATF-1/2/6: fatores de transcrição dependentes de AMP 1/2/6; DDIT3: fator de transcrição induzido por dano ao DNA 3; IL-1 β : interleucina 1 *beta*; IL-1R: receptor de interleucina 1; LPS: lipopolissacarídeo; LSP1: proteína específica de linfócitos 1; MAPKK3: proteína quinase dupla ativada por mitógeno 3; MAPKK6: proteína quinase dupla ativada por mitógeno 6; MEF2: fator otimizador de miócitos 2; MNK1: quinase interativa com MAPKs 1; SRF: fator de resposta sérica; TLR4: receptor do tipo *Toll-like* 4; TNF- α : fator necrose tumoral *alpha*; TNFR: receptor de fator necrose tumoral; TTP: tristetraprolina. Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de ZARUBIN e HAN (2005).

Assim como o NF- κ B, a p38 também vem sendo alvo de pesquisa para desenvolvimento de novos fármacos com ação anti-inflamatória uma

vez que está MAPK tem papel central no desenvolvimento do processo inflamatório (LEE; DOMINGUEZ, 2005; MILLAN, 2011; MACNEE et al., 2013). Atualmente, oito moléculas com ação inibitória sobre a p38 estão em fase II de testes clínicos para o tratamento de doenças inflamatórias (ARTHUR; LEY, 2013).

2.7. Modelos de inflamação das vias aéreas

Com a finalidade de mimetizar doenças inflamatórias humanas, diversos modelos *in vivo* foram desenvolvidos nos últimos 80 anos. No decorrer deste tempo ficou claro que, embora alguns modelos muitas vezes apresentem perfis biológicos semelhantes com aspectos de certas doenças, eles não representam as doenças em si e sim reações causadas por estas. Ainda assim, modelos animais de artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais e esclerose múltipla, por exemplo, têm sido de extrema utilidade para o desenvolvimento de novas terapias para estas doenças, além de ajudar no entendimento do próprio sistema imunológico humano (WEBB, 2014).

Atualmente diferentes modelos podem ser empregados para mimetizar condições patológicas estabelecidas na asma, uma doença de cunho inflamatório que ainda oferece grandes desafios para a medicina moderna. Estes modelos oferecem informações importantes em aspectos chaves da asma como sua patogênese e tratamento. O uso de camundongos para modelos inflamatórios das vias aéreas é comum devido a esta espécie oferecer facilidades no que diz respeito ao emprego de ferramentas imunológicas, como por exemplo a deleção de genes, além da facilidade de seu manuseio. Apesar disso, assim como em outros modelos animais, camundongos também oferecem limitações. Nenhum camundongo desenvolve asma espontaneamente, e nenhum modelo é capaz de mimetizar todo o fenótipo da asma. Estes modelos são então focados nas mudanças das funções pulmonares características da asma (KIPS et al., 2003).

O modelo experimental de asma murina mais utilizado é o eosinofílico. Neste modelo, camundongos da linhagem BALB/c são sensibilizados com ovalbumina (OVA). Desta forma torna-se possível avaliar mecanismos celulares presentes na asma alérgica, uma vez que a OVA inalada é capaz de induzir uma resposta alérgica imediata e uma tardia. Neste modelo a migração leucocitária é caracterizada por eosinofilia no lavado broncoalveolar, além de hiperresponsividade nas

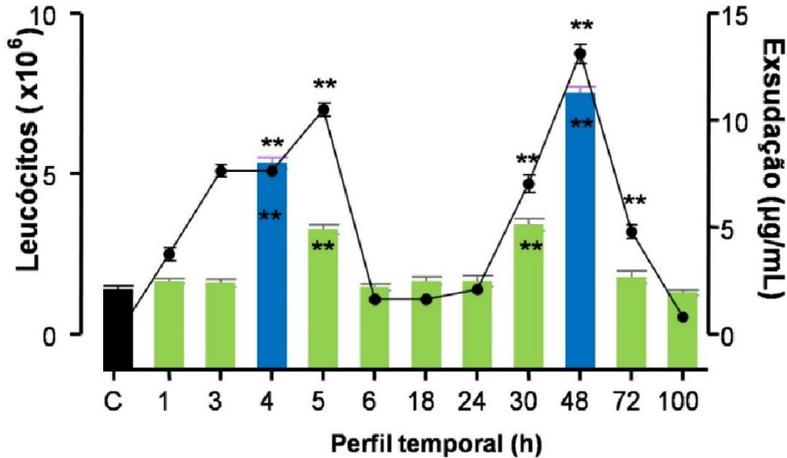
vias aéreas, inflamação e, tardiamente, remodelamento do tecido lesionado. Este é um modelo clássico de 21 dias para asma alérgica, embora já existam ajustes para reduzir os experimentos para 8 dias, além de um modelo crônico de 51 dias para linhagens C57BL/6 (DAUBEUF; FROSSARD, 2014).

Partículas virais também são frequentemente utilizadas em modelos de inflamação das vias aéreas, uma vez que infecções além de serem comuns podem se tornar mais graves em pacientes com asma brônquica e/ou doenças pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Nestes modelos são inoculadas partículas de vírus em camundongos por via respiratória, podem ser utilizadas partículas do vírus Sendai ou pneumovírus. Neste modelo é possível avaliar o remodelamento das vias aéreas, a liberação de mediadores inflamatórios e a migração celular. Apesar de sua utilidade, este modelo oferece limitações já que exige infraestrutura adequada e rigorosas condições de biossegurança, considerando o cultivo de vírus e a metodologia empregada (GRAHAM et al., 1988; TOURDOT et al., 2008).

Para indução de parâmetros inflamatórios que mimetizam a asma neutrofílica tem-se utilizado o modelo de pleurisia. Para indução da inflamação neste tipo de modelo diferentes agentes flogísticos e concentrações destes tem sido empregado, os agentes flogísticos mais comumente utilizados são a carragenina e o LPS.

A resposta inflamatória desencadeada pela administração intrapleural da carragenina é bifásica, semelhante a asma. Em um primeiro momento (4 horas após administração da carragenina a 1%) uma resposta aguda é desenvolvida caracterizada pela massiva migração neutrofílica para cavidade pleural, além de formação de exsudato. Seguindo esta fase inicial, na fase tardia (48 horas após administração da carragenina a 1%), ocorre o início do remodelamento tecidual com a inversão no perfil leucocitário, ou seja, aumento de células mononucleares, porém ainda com presença de exsudato (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996) (**Figura 6**).

Figura 6. Perfil temporal do modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos



A resposta inflamatória do modelo da pleurisia induzida pela carragenina é bifásica. Em sua primeira fase (4 horas) uma resposta aguda é desenvolvida caracterizada pela massiva migração neutrofilica para cavidade pleural, além de formação de exsudato. Em sua segunda fase (48 horas) ocorre o início do remodelamento tecidual com a inversão no perfil leucocitário, ou seja, aumento de células mononucleares, porém ainda com presença de exsudato. Fonte: adaptado de SALEH; CALIXTO e MEDEIROS (1996).

A carragenina, um polissacarídeo altamente sulfatado obtido de algas vermelhas (Rodophyceae), tem a capacidade de ativar a resposta imune inata se ligando a TLR4 ou através da geração de EROs. Após se ligar ao TLR4, a carragenina ativa uma cascata de sinalização mediada por diversas proteínas adaptadoras e quinases. A via canônica do NF- κ B é ativada por estas proteínas, além da via das MAPKs. A carragenina também é capaz de reduzir as concentrações de proteína de choque térmico 27 (Hsp27) através da formação de EROs. A diminuição na concentração da Hsp27 está envolvida na ativação de quinases que por sua vez também tem relação com a ativação do NF- κ B e via das MAPKs (DONG et al., 2006; BHATTACHARYYA; DUDEJA; TOBACMAN, 2008).

Na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos há um aumento massivo da migração leucocitária para a cavidade pleural e formação de exsudato. Além disso, no lavado pleural é possível quantificar enzimas relacionadas ao processo inflamatório, metabólitos

do óxido nítrico e citocinas. No tecido pulmonar extraído neste modelo ainda existe a possibilidade da avaliação da ativação de fatores de transcrição e quinases ativadas por mitógeno importantes para a inflamação, como o NF- κ B e a p38 MAPK, além da extração de material genético para quantificação de mRNA de diversos mediadores inflamatórios.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito anti-inflamatório da *Polygala sabulosa* A.W. Bennett e analisar o provável mecanismo de ação de seu composto majoritário, 7-preniloxi-6-metoxicumarina, no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

3.2. Objetivos específicos

- I. Caracterizar e quantificar o composto majoritário, 7-preniloxi-6-metoxicumarina, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) no extrato bruto hidroalcoólico;
- II. Avaliar o efeito do extrato bruto, frações e do composto isolado, sobre a migração dos leucócitos e a exsudação no lavado da cavidade pleural;
- III. Avaliar o efeito do extrato bruto, frações e do composto isolado sobre a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA), e sob as concentrações dos metabólitos do óxido nítrico (NO_x) no lavado da cavidade pleural;
- IV. Avaliar o efeito do extrato bruto, frações e composto isolado sobre as concentrações do fator de necrose tumoral *alpha* ($\text{TNF-}\alpha$) e da interleucina-1 *beta* ($\text{IL-1}\beta$) no lavado da cavidade pleural;
- V. Avaliar o efeito do composto isolado sobre a expressão do RNA mensageiro (mRNA) do $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos pulmões;
- VI. Avaliar o efeito do composto isolado sobre a fosforilação da subunidade p65 (RelA) do fator nuclear *kappa* B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) nos pulmões;

- VII. Avaliar o efeito do composto isolado sobre a fosforilação da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38-MAPK) nos pulmões.

4. Materiais e Métodos

4.1. Coleta do material vegetal

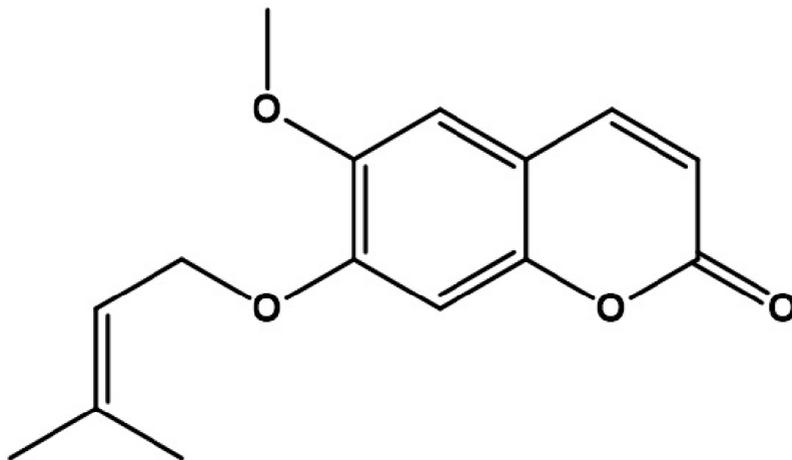
O material vegetal da *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (toda a planta) foi coletado em outubro de 2006 no município de Rancho Queimado (27°40'21" S e 49°01'18" W), Santa Catarina – Brasil. A espécie foi identificada pelo Dr. Olavo de Araújo Guimarães (Universidade Federal do Paraná - UFPR) e sua exsicata depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná com a numeração de 19640.

4.2. Obtenção do extrato, frações e composto isolado

Após secagem em estufa com circulação de ar a 50 °C, o material vegetal seco (410,0 g) foi macerado e submetido a extração com etanol 96% a temperatura ambiente. Após 7 dias de extração o extrato obtido foi filtrado e o etanol evaporado, utilizando um rota-evaporador sob pressão reduzida a 50 °C. Este procedimento resultou no extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 111,0 g) que foi submetido a um fracionamento sólido-líquido com *n*-hexano, acetona e metanol em ordem crescente de polaridade. Os solventes foram removidos sob pressão reduzida e desta forma obteve-se a frações: hexânica (Hex: 10,8 g), acetônica (Ac: 33,6 g) e metanólica (MeOH: 55,4 g).

Uma parte da fração acetônica (30,0 g) foi submetida a uma coluna de sílica gel e eluída com gradientes crescentes de acetato de etila (EtOAc) em *n*-hexano (0,5:5; 1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 5:5; 6:4; 7:3; 8:2; 9:1; 10:0). As subfrações obtidas foram monitoradas através de cromatografia em camada delgada (CCD) e subfrações com perfis similares foram reunidas. As subfrações 13-21 foram novamente fracionadas por cromatografia em coluna onde obteve-se o composto 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC) (5:5 de EtOAc:*n*-hexano) (3,3 g), que apresentou-se como pequenos cristais brancos com ponto de fusão de 79-80 °C. A estrutura da PC (**Figura 7**) foi confirmada por comparação dos resultados obtidos com dados previamente publicados, comparando-se dados de RMN ¹H e ¹³C (PIZZOLATTI; LUCIANO; DELLE MONACHE, 2000; PIZZOLATTI et al., 2004).

Figura 7. Estrutura química da 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC)



Estrutura química da 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC), composto isolado da *Polygala sabulosa* A.W. Bennett. Fonte: adaptado de PIZZOLATTI; LUCIANO e DELLE MONACHE (2000).

4.3. Perfil cromatográfico e quantificação do composto majoritário por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

O perfil cromatográfico do EBH foi obtido utilizando um cromatógrafo Shimadzu® Prominence LC20AT (Kyoto, Japão), equipado com injetor automático SIL-20A, bombas alternadas LC-20AT conectadas a um *degasser* DGU-20A5R, controlador CBM-20A, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A e software LC solution® versão 1.25. A análise cromatográfica foi realizada com uma coluna CLC-C₁₈ (ODS, 4,6 mm x 250 mm, 5 μm) (Shimadzu, Kyoto, Japão), protegida por uma coluna de guarda (Shimadzu, Kyoto, Japão), e a absorvância foi medida num alcance de 200-400 nm. Os seguintes solventes foram utilizados na fase móvel: (A) solução aquosa com 0,1% ácido acético (v/v), e (B) solução metanólica com 0,1% ácido acético (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min. O forno foi ajustado para manter a temperatura da coluna a 40 °C e o volume de injeção das amostras foi de 20 μL. O seguinte perfil de eluição foi utilizado: 0-25 min, de 30% para 55% (B) (gradiente); 25-43 min, de 55% para 85% (B) (gradiente); 43-45 min, de 85% para 100% (B) (gradiente); 45-48 min, 100% (B) (isocrático); 48-49 min, de 100%

para 30% (B) (gradiente) e 49-50 min, 30% (B) (isocrático). O período de equilíbrio de 10 minutos entre a injeção das amostras também foi incluído nas análises. O cromatograma foi monitorado em 344 nm. A quantificação do composto isolado presente no EBH foi obtida através de uma curva padrão utilizando o composto isolado previamente certificado (RMN H¹ e C¹³). A curva padrão para este composto foi produzida com 5 diferentes concentrações, testadas em triplicata, resultando na seguinte equação da reta: $y = 888664,1x - 1193310$; $R^2 = 0,999$.

4.4. Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos albinos *Swiss* com 2 meses de idade, fêmeas, pesando entre 18-22 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram acondicionados em instalações próprias no Laboratório de Pesquisa em Imunologia (LAPI/UFSC) com ciclos de luz alternados (12/12 horas), temperatura controlada 20 ± 2 °C acesso livre a ração e água tratada.

Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob protocolo PP00757 (ANEXO I) e os experimentos foram realizados de acordo com Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

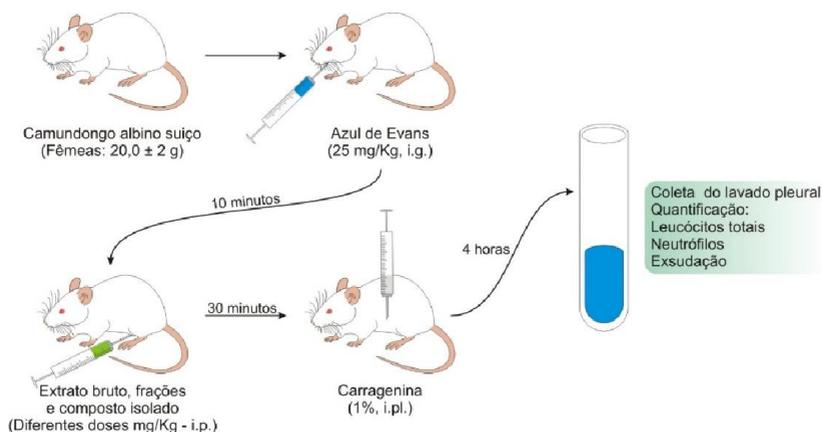
4.5. Protocolo experimental

O modelo experimental adotado foi a da pleurisia induzida pela carragenina (Cg) em camundongos. Para indução da pleurisia, foi utilizado uma injeção de 0,1 mL do agente flogístico, Carragenina 1% (Cg), administrado na cavidade pleural direita, através do espaço intercostal, utilizando-se uma agulha 13x5 mm e cânula de poliestireno (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Todos os parâmetros inflamatórios foram avaliados 4 h após a indução do processo inflamatório. Após os animais sofrerem morte indolor assistida através uma injeção de pentobarbital (120 mg/kg, i.p.) o tórax foi aberto e a cavidade pleural foi lavada com 1 mL de salina estéril tamponada (PBS, pH 7,6, composição mM: NaCl 130, Na₂HPO₄ 5, KH₂PO₄ 1 em água destilada) e heparinizada (20 UI/mL). Amostras do lavado pleural foram coletadas para determinação da migração leucocitária (total e diferencial), exsudação, atividades da mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase

(ADA), metabólitos do óxido nítrico (NO_x), além das concentrações das citocinas pró-inflamatórias $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$. Amostras do tecido pulmonar foram utilizadas para avaliar a expressão de mRNA de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e iNOS , além da fosforilação da subunidade p65 ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) e p38 (MAPK). Os animais foram tratados por via intragengival (i.g.) com 0,2 mL de uma solução de corante Azul de Evans (25 $\mu\text{g/mL}$) somente nos grupos nos quais foi avaliada a exsudação e contagem de leucócitos.

Inicialmente, o EBH, suas frações derivadas (Hex, Ac e MeOH) e o composto isolado, PC, foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) com a finalidade de analisar a possível atividade anti-inflamatória. Todo material vegetal (EBH e frações) e composto isolado foram dissolvidos em solução de salina contendo no máximo 10% de DMSO para auxiliar no processo de dissolução de compostos lipofílicos. Neste protocolo, diferentes grupos de animais foram tratados (0,5 h antes) com diferentes doses de EBH (25-200 mg/kg, i.p.), Hex (1-25 mg/kg, i.p.), Ac (1-25 mg/kg, i.p.), MeOH (1-25 mg/kg, i.p.) ou PC (0,1-5 mg/kg, i.p.) e os parâmetros inflamatórios (migração leucocitária e exsudação) foram analisados no lavado pleural 4 h após a administração do agente flogístico (Cg: 1%) (**Figura 8**).

Figura 8. Protocolo experimental para curva dose-resposta do EBH, frações e composto isolado da *P. sabulosa* no modelo de pleurisia induzida pela carragenina

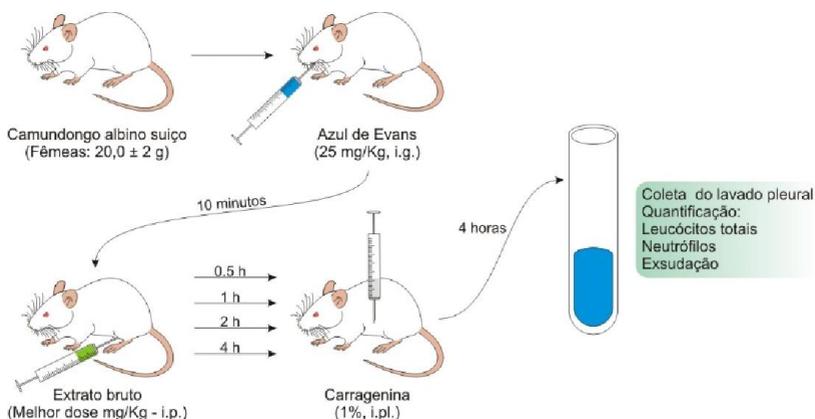


Inicialmente foi administrado uma solução de Azul de Evans (25 mg/kg) a todos os animais por via intra-gengival para que a exsudação fosse posteriormente quantificada. Após 10 minutos da aplicação do Azul de Evans os animais receberam: salina (Grupo S) ou tratamento com diferentes doses de extrato bruto hidroalcoólico, frações ou composto isolado da *P. sabulosa* por via intraperitoneal. Paralelamente um grupo controle recebeu tratamento com dexametasona (Grupo Dex: 0,5 mg/kg; i.p.). Passados 30 minutos do tratamento foi administrado por via intrapleurar carragenina a 1%, exceto nos animais do grupo S. Os animais sofreram morte indolor assistida 4 horas após a aplicação da carragenina e os parâmetros iniciais: leucócitos totais, neutrófilos e exsudação foram quantificados no lavado pleural. i.g.: administração intragengival; i.p.: administração intraperitoneal; i.pl.: administração intrapleurar. Fonte: elaborado pelo autor.

Em outro experimento, realizado paralelamente, com a intenção de definir a curva tempo-resposta, diferentes grupos de animais foram tratados com EBH, na melhor dose definida no experimento anterior, administrada em diferentes períodos antes da indução da pleurisia (0,5-4 h) e então os parâmetros inflamatórios (migração leucocitária e exsudação) foram avaliados 4 h após aplicação da carragenina (**Figura 9**). De acordo com este protocolo, o EBH na melhor dose resposta pré-estabelecida (50 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da indução da

pleurisia, apresentou os melhores resultados. Sendo assim, o mesmo período de pré-tratamento foi utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório das frações (Hex, Ac e MeOH) e do composto isolado (PC).

Figura 9. Protocolo experimental para curva tempo-resposta do EBH da *P. sabulosa* no modelo de pleurisia induzida pela carragenina

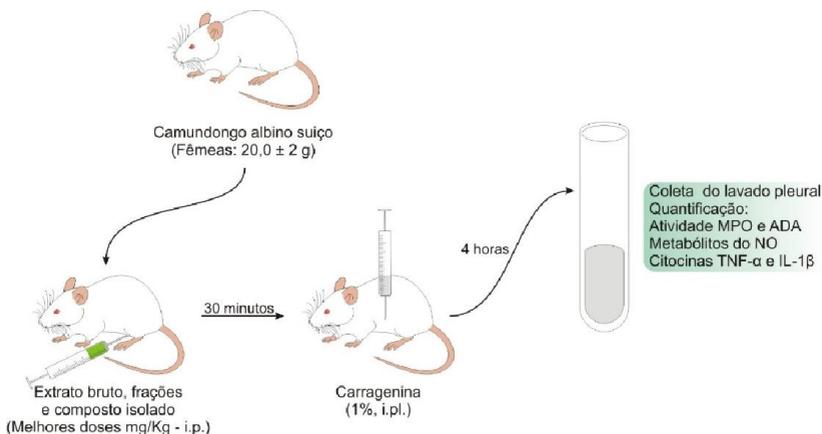


Inicialmente foi administrado uma solução de Azul de Evans (25 mg/kg) a todos os animais por via intra-gengival para que a exsudação fosse posteriormente quantificada. Após 10 minutos da aplicação do Azul de Evans os animais receberam tratamento com a melhor dose de extrato bruto hidroalcoólico da *P. sabulosa* por via intraperitoneal definido no experimento de dose-resposta. Paralelamente um grupo controle recebeu tratamento com dexametasona (Grupo Dex: 0,5 mg/kg; i.p.). Passados 0,5, 1, 2 ou 4 horas (diferentes grupos) do tratamento foi administrado por via intrapleural uma solução de carragenina a 1% para induzir o processo de pleurisia exceto nos animais do grupo salina. Os animais sofreram morte indolor assistida 4 horas após a aplicação da solução de carragenina e os parâmetros iniciais: leucócitos totais, neutrófilos e exsudação foram quantificados. i.g.: administração intragengival; i.p.: administração intraperitoneal; i.pl.: administração intrapleural. Fonte: elaborado pelo autor.

Finalmente, após obtermos o melhor tempo de pré-tratamento e as melhores doses de cada fração e composto capaz de inibir a migração leucocitária e a exsudação na cavidade pleural, diferentes grupos de animais foram pré-tratados com EBH (50 mg/kg, i.p.), Hex (25 mg/kg, i.p.), Ac (25 mg/kg, i.p.), MeOH (25 mg/kg, i.p.) e PC (1 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia com carragenina. Essas doses foram

utilizadas para analisar outros parâmetros inflamatórios como: atividades da MPO e ADA, concentrações de NO_x e concentrações das citocinas pró-inflamatórias $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ (**Figura 10**).

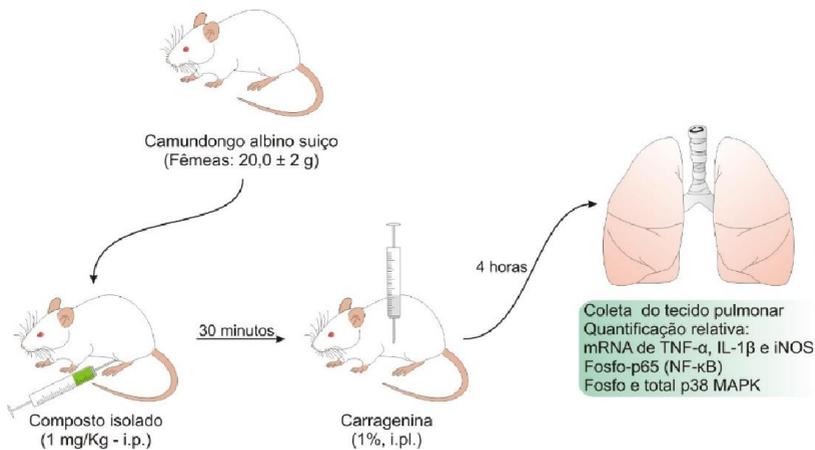
Figura 10. Protocolo experimental para determinação da atividade anti-inflamatória do EBH, frações e composto isolado da *P. sabulosa* no modelo de pleurisia induzida pela carragenina



Inicialmente os animais receberam tratamento com as melhores doses de extrato bruto hidroalcoólico, frações e composto isolado da *P. sabulosa* por via intraperitoneal definido no experimento de dose-resposta. Paralelamente um grupo controle recebeu tratamento com dexametasona (Grupo Dex: 0,5 mg/kg; i.p.). Passados 30 minutos do tratamento foi administrado por via intrapleural a carragenina a 1% para induzir o processo de pleurisia exceto nos animais do grupo salina. Os animais sofreram morte indolor assistida 4 horas após a aplicação da carragenina e os parâmetros: atividade das enzimas MPO e ADA, concentração de metabólitos do óxido nítrico e das citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ foram quantificados. ADA: adenosina deaminase; i.g.: administração intragengival; $\text{IL-1}\beta$: interleucina 1 *beta*; i.p.: administração intraperitoneal; i.pl.: administração intrapleural; MPO: mieloperoxidase; NO: óxido nítrico; $\text{TNF-}\alpha$: fator necrose tumoral *alpha*. Fonte: elaborado pelo autor.

A expressão de mRNA para $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e iNOS, assim como fosforilação da subunidade p65 ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) e p38 (MAPK) foram analisados somente em animais tratados com o composto isolado (**Figura 11**).

Figura 11. Protocolo experimental para determinação do mecanismo de ação do composto isolado da *P. sabulosa* no modelo de pleurisia induzida pela carragenina



Inicialmente os animais receberam tratamento com a melhor dose de composto isolado da *P. sabulosa* por via intraperitoneal definido no experimento de dose-resposta. Paralelamente um grupo controle recebeu tratamento com dexametasona (Grupo Dex: 0,5 mg/kg; i.p.). Passados 30 minutos do tratamento foi administrado por via intrapleurar a carragenina a 1% exceto nos animais do grupo salina. Os animais sofreram morte indolor assistida 4 horas após a aplicação da carragenina e os parâmetros: mRNA de TNF- α , IL-1 β e iNOS, subunidade p65 fosforilada do NF- κ B e p38 MAPK total e fosforilada foram quantificados. i.g.: administração intragengival; IL-1 β : interleucina 1 *beta*; iNOS: óxido nítrico sintase induzida; i.p.: administração intraperitoneal; i.pl.: administração intrapleurar; mRNA: ácido ribonucleico mensageiro; NF- κ B: fator nuclear *kappa* B; NO: óxido nítrico; p38 MAPK: quinase ativada por mitógeno p38; p65: subunidade do fator nuclear *kappa* B; TNF- α : fator necrose tumoral *alpha*. Fonte: elaborado pelo autor.

Paralelamente, diferentes grupos de animais foram utilizados como grupos controles (positivo, negativo e padrão anti-inflamatório). Em síntese, os grupos utilizados foram os seguintes: (1) Grupo S, onde os animais foram submetidos a administração de salina (NaCl 0,95%, i.pl) (n = 6); (2) Grupo Cg, em que os animais foram submetidos a administração de carragenina (Cg: 1%, i.pl.) (n = 6); (3) Grupo Dex,

animais onde foi administrada dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da administração da carragenina (1%, i.pl.) (n = 6).

4.6. Contagem total e diferencial de leucócitos

Para contagem total de leucócitos foi utilizado um contador de leucócitos automatizado com parâmetros de quantificação especificados e calibrados para camundongos (MINDRAY, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada após a confecção de lâminas, as quais foram submetidas a coloração pela técnica de May-Grünwald-Giemsa e a contagem feita em microscópio ótico comum (x1000). Os resultados foram expressos em número total de leucócitos e/ou neutrófilos ($\times 10^6$).

4.7. Determinação da exsudação

Para determinação indireta da concentração de exsudato, os animais foram tratados com uma solução de corante Azul de Evans (25 mg/kg; 0,2 mL/animal; i.g.) 10 minutos antes da indução do processo inflamatório. O Azul de Evans liga-se a proteínas plasmáticas como a albumina, desta forma é possível quantificar o aumento da exsudação no local inflamado através da quantificação do próprio corante (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Após 4 h da indução da pleurisia os animais sofreram morte indolor assistida e uma alíquota de 200 μ L do lavado pleural foi reservado para quantificação da exsudação. Para tal, as alíquotas foram pipetadas em uma placa contendo 96 poços e em seguida lidas em leitora de microplacas (Organon, Técnica, Roseland, New Jersey, EUA) com comprimento de onda ajustado para 620 nm.

Para quantificação das concentrações do Azul de Evans nas amostras, uma curva padrão (0,1 – 25 μ g/mL) foi previamente determinada. Através da equação da reta foi possível se estimar a concentração de Azul de Evans nas amostras. Os valores para concentração de Azul de Evans foram expressos em μ g/mL.

4.8. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Os ensaios para determinação da atividade da MPO foram realizados de acordo com a metodologia descrita por RAO et al. (1993). Após a coleta do lavado pleural, processamento e centrifugação em centrífuga refrigerada (250 g por 5 min a 4 °C) (Sorvall™ ST 40, Thermo Scientific®, Swedesboro, NJ, EUA), o sobrenadante (20 µL) foi coletado e imediatamente submetido a determinação da atividade MPO. Com este objetivo, os sobrenadantes foram transferidos para uma placa de 96 poços onde foi adicionado 180 µL de solução de reação (0,167 mg/mL de o-dianisidina, 2 HCl e 0,0005% de H₂O₂). Após 15 minutos de incubação, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com adição de 30 µL de azida sódica (1%) (*p/v*). A seguir as placas foram lidas em uma leitora de microplacas (Organon, Technica, Roseland, New Jersey, EUA) ajustada para comprimento de onda de 450 nm. Uma curva-padrão com atividades conhecidas da MPO (0,7–140 mU/mL) teve sua densidade ótica determinada, permitindo desta forma a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores de MPO foram expressos em mU/mL.

4.9. Determinação da atividade da adenosina-deaminase (ADA)

Para determinação da atividade da enzima ADA, amostras padrão com concentrações conhecidas (volume final 2,5 mL) de NaH₂PO₄.H₂O (35 mM), Na₂HPO₄.12H₂O (15 mM) e (NH₄)₂SO₄ (15 mM) foram preparadas com a finalidade de obter-se uma curva padrão (10-50 UI/L). As amostras de lavado pleural, após centrifugação (250 g por 5 min a 4 °C), foram transferidas para tubos de ensaio e a reação enzimática iniciou-se com a adição da solução de adenosina fosfato (pH 6,5, 500 µL, composição: NaH₂PO₄.H₂O (35 mM), Na₂HPO₄.12H₂O (15 mM) e adenosina (0,5 mM)). Após 1 hora de incubação a temperatura de 37 °C, a reação enzimática foi interrompida através da adição de uma solução de fenol (1000 µL, 1 mM), nitroprussiato de sódio (0,17 mM) e tampão alcalino (1000 µL: NaOCl: 11 mM e NaOH: 125 mM). Esta mesma solução foi adicionada também aos tubos de vidro da curva padrão (volume final 2500 µL) (GIUSTI; GALANTI, 1984). Finalmente, transferiu-se 200 µL das amostras para uma placa de 96 poços e a seguir as placas foram lidas em uma leitora de microplacas (Organon, Technica, Roseland, New Jersey, EUA) no comprimento de onda de 620 nm. Os valores de ADA foram expressos em U/L.

4.10. Determinação das concentrações de nitrito e nitrato (NO_x)

As concentrações de óxido nítrico (NO) foram indiretamente determinadas através da formação de seus metabólitos: nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Para tal utilizou-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982). As amostras do lavado pleural (300 μL) foram desproteinizadas no dia dos experimentos com 30 μL de solução de sulfato de zinco (ZnSO_4 , 20%). As amostras foram então incubadas em banho de gelo por 60 minutos, e adicionado 6 μL de solução de hidróxido de sódio (NaOH, 2,5 N). Em seguida foram centrifugadas (2.500 RPM por 15 minutos) obtendo-se um sobrenadante límpido. A seguir, 100 μL dos sobrenadantes foram transferidos para tubos de ensaio e diluídos em solução contendo 100 μL de solução saturada de cloreto de vanádio III (VCl_3 , 0,8%) (*p/v*) e ácido clorídrico (HCl, 3%) (*v/v*). Neste mesmo tubo foram adicionados 100 μL de solução de Griess (composição: sulfonamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 1%) ácido fosfórico (H_3PO_4 , 5%) e N-(1-naftil) etilenodiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$, 0,1%) e a mistura foi incubada durante 40 minutos a 37 °C (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio de leitura das densidades óticas em uma placa de 96 poços, lidas em uma leitora de microplacas (Organon, Tcknica, Roseland, New Jersey, EUA) no comprimento de onda de 540 nm. Curvas padrão com concentrações conhecidas de NO_2^- (0-150 μM) também tiveram as densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato em μM , com auxílio da equação da reta.

4.11. Determinação das concentrações das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β)

Nestes experimentos, amostras de lavado pleural foram coletadas imediatamente após os animais sofrerem morte indolor assistida, e processadas para realização da técnica de enzimmunoensaio (ELISA), método sanduíche. Neste protocolo foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . Padrões com concentrações conhecidas foram usados conforme instruções fornecidas pelo kit dos fabricantes de TNF- α (BD Biosciences Pharmigen, São Diego, California, EUA) e IL-1 β (RayBiotech Inch,

Norcross, Georgia, EUA). As sensibilidades identificadas nos kits foram: TNF- α = 5,0 pg/mL e IL-1 β = 1,67 pg/mL. Os coeficientes de variação (CV) intra e interensaios observados foram: intra CV: TNF- α = 7,8 \pm 0,9%, IL-1 β = 6,2 \pm 0,4%; inter CV: TNF- α = 9,6 \pm 2,1%, IL-1 β = 5,1 \pm 0,6%. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de cada citocina, TNF- α (5,0-2300 pg/mL) e IL- 1 β (11,72-750 pg/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas em comprimento de onda de 450 nm, desta forma foi possível quantificar a presença destas citocinas nas amostras estudadas com auxílio de uma equação da reta. As leituras das amostras foram todas realizadas em placas de 96 poços em uma leitora de microplacas (Organon, Tcknica, Roseland, New Jersey, EUA). Os valores para citocinas foram expressos em pg/mL.

4.12. Determinação da expressão do mRNA para as citocinas pró inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e para enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS)

4.12.1. Extração e quantificação do RNA

O RNA total foi extraído de amostras de pulmão dos camundongos utilizando TRI-reagent® (Sigma-aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Inicialmente, em um tubo de eppendorf foi adicionado 1 mL de TRI-reagent®, em seguida 200 mg do tecido pulmonar foi mergulhado e imediatamente macerado com auxílio de um aparato cirúrgico livre de RNAses. O material pulmonar foi então homogeneizado com auxílio de vortex por 30 segundos. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente (25 °C), adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio (P.A.), e o material foi então homogeneizado e incubado por mais 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se o material (12.000 g à 4 °C) por 15 minutos, a fase superior (aquosa) foi então transferida para outro tubo do tipo eppendorff onde adicionou-se 0,5 mL de isopropanol (P.A.). Novamente, seguiu-se uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente. Terminada esta etapa, o material foi novamente centrifugado por 10 minutos a 12.000 g (4 °C), e o RNA total presente no sedimento foi recuperado. Para tanto, o sobrenadante foi desprezado e lavado com 1 mL de etanol (70%, v/v). Finalmente, procedeu-se uma última centrifugação a 7.500 g (4 °C) por 5 minutos, e novamente o descarte do sobrenadante com posterior secagem do material

em estufa (40 °C) por 10 minutos. A seguir, foi adicionado 100 µL de água livre de RNAses (0,01% DEPC – v/v) (DALMARCO et al., 2012).

Ao final do processo de extração, a determinação da concentração e da pureza do RNA, foram checadas por leitura espectrofotométrica a 260 nm e pela razão da absorbância 260/280 nm, respectivamente (Pico100 Picodrop® Spectrophotometer, Picodrop Limited, Cambridgeshire, UK).

4.12.2. Reação de transcrição reversa (RT)

As amostras de RNA previamente extraídas foram tratadas com a enzima DNase grade I® para eliminar a contaminação das amostras com DNA genômico, segundo instruções fabricante (Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia, EUA). Em seguida 500 ng de RNA total obtido de cada amostra foram transferidos para microtubos com capacidade de 200 µL onde foi adicionado 50 µM de oligonucleotídeo (Oligo dT 12-18)®, 10 mM de dNTPs e 6 µL de água DEPC (0,01%), que após rápida homogeneização foram incubadas por 5 minutos a 65 °C e, a seguir, acondicionados em banho de gelo por 2 minutos (Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia, EUA).

No próximo passo, seguiu-se a adição de 4 µL de solução tampão (First Strand® Buffer 5x), 1 µL de enzima inibidora de RNAses (Ribolock® 20U) e 1 µL de enzima Superscript III® (200 U) totalizando um volume final de 20 µL. Esta solução foi homogeneizada manualmente e incubada por 1 hora à 60 °C. Após a incubação, os microtubos contendo DNA complementar (cDNA) foram incubados a 70 °C por 15 minutos. Finalmente, os microtubos foram armazenados em freezer (-80 °C) até o momento da realização das reações de PCR em tempo real (qPCR) (DALMARCO et al., 2012).

4.12.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas utilizando-se 50 ng de cDNA (obtidos da reação de transcrição reversa), iniciadores específicos para amplificação dos genes de interesse (TNF- α , IL-1 β e iNOS: 0,5 µM) adicionados a um *master mix* para qPCR Ludwig Biotec® SYBR Green qPCR mix 1:1 ROX (2x) (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil) totalizando um volume final de 12,5 µL. As amostras foram

pipetadas em placas de 96 poços *fast* qPCR (StepOnePlus®, Applied Biosystems, Carlsbad, Califórnia, EUA).

As condições empregadas na reação de qPCR foram as seguintes: 1) 5 minutos à 95 °C; 2) 40 ciclos com 3 etapas de: 45 segundos à 95 °C, 45 segundos à 58° C e 45 segundos a 72 °C. Todas as reações foram seguidas de análise da curva de *melting* para detectar possíveis contaminações ou amplificação de produtos inespecíficos nas reações. Além disso para excluir a possibilidade de contaminação, foram realizados controles negativos contendo água miliQ como amostra. Como controle endógeno de cada amostra, foram utilizados iniciadores que amplificam o GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) de expressão constitutiva. As sequencias de nucleotídeos de cada iniciador estão descritos na **Tabela 1**. Para o cálculo da expressão dos mRNA utilizou-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 1. Oligonucleotídeos (iniciadores) usados nas reações de RT-qPCR.

Gene	Iniciadores	Produto (p.b.)	Registro no GenBank
GAPDH	GTGTCCGTCGTGGATCTGAC GGAGACAACCTGGTCCTCAG	132	NM_00128972 6.1
TNF- α	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT GCTACGACGTGGGCTACAG	61	NM_013693.3
IL-1 β	TTCAGGCAGGCAGTATCACTC GAAGGTCCACGGGAAAGACAC	75	NM_008361.3
iNOS	CGAAGTTTCTGGCAGCAGC AGCACTCTCTTGC GGACCAT	146	NM_010927.3

4.13. Determinação da fosforilação da proteína p65 (NF- κ B) e p38 (MAPK)

4.13.1. Dosagem de proteínas totais

Após os animais sofrerem morte indolor assistida, 20 mg de tecido pulmonar de cada amostra foi removido da cavidade torácica e transferido para tubo de eppendorf contendo tampão de lise - Cell Lysis

Buffer 5x (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA) com intuito de formar o homogenato. A dosagem de proteínas totais foi realizada de acordo com LOWRY et al. (1951) em espectrofotômetro (LOWRY et al., 1951). Em síntese, a 5 µL de amostra foi adicionado 95 µL de água destilada e então adicionou-se 100 µL de reagente de Lowry (25% de CTC: carbonato de sódio: Na₂CO₃ - 10%, sulfato de cobre: CuSO₄ 0,1%, tartarato duplo Na/K 0,2%; 25% de SDS a 10%; 20% de NaOH 0,8 N e 30% de água destilada). Após incubação a temperatura ambiente por 10 minutos adicionou-se 50 µL de reagente de Folin (40% de Reativo de Folin 1 N, 20% de Reativo de Folin 2 N e 40% água destilada), em seguida as amostras foram incubadas por 30 minutos, e após este período, pipetadas em placas de 96 poços, que foram lidos em leitora de microplacas em comprimento de onda de 620 nm (Organon, Tcknica, Roseland, New Jersey, EUA). Paralelamente utilizou-se diferentes concentrações de albumina para obter-se uma curva-padrão (0-40 µg/µL).

Desta forma, para a determinação da fosforilação das proteínas p65 e p38, as amostras foram ajustadas a concentração de 60 µg de proteína total, conforme sugerido pelos fabricantes dos kits de p65 (NF-κB) e de p38 MAPK.

4.13.2. Quantificação da proteína p65 fosforilada

Para este protocolo foi utilizado kit comercial contendo anticorpos monoclonais específicos contra proteína p65 fosforilada de camundongo (Instant One Phospho - NF-κB p65 (Ser536) ELISA Kit (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA)). O protocolo experimental foi realizado seguindo instruções disponíveis no kit. Os resultados foram expressos como modificação relativa comparada ao grupo controle negativo (Salina), que representou a expressão basal da fosforilação da subunidade p65.

4.13.3. Quantificação da proteína p38 total e fosforilada

Assim como na quantificação da fosforilação da proteína p65, as amostras ajustadas pelo método de Lowry para possuírem a mesma concentração de proteínas (60 µg) foram transferidas para uma placa de 96 micropoços a qual continha fixados anticorpos monoclonais específicos contra proteína p38 MAPK total (p38 MAP Kinase Elisa (Invitrogen, Camarillo, Califórnia, EUA)) e outra placa contendo

anticorpos monoclonais contra a proteína p38 MAPK fosforilada (Instant One Phospho-p38 MAPK – Tyr180/Tyr182 – Elisa kit (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA)). Os resultados foram expressos em modificação relativa comparada ao grupo controle negativo (Salina), que representou a expressão basal da proteína p38 MAPK total e fosforilada.

4.14. Fármacos e reagentes

Neste estudo, foram utilizados os seguintes fármacos e reagentes: Dexametasona (Ache pharmaceutical laboratories S.A., São Paulo, São Paulo, Brasil), adenosina, azida sódica, carragenina- λ (grau IV), cloreto de vanádio III, hidróxido de sódio, sulfanilamida, nitroprussiato de sódio, fenol, MPO de neutrófilos humanos, dodecil sulfato de sódio, o-dianisidina 2HCl (3,3'-dimetoxibenzidina), iniciadores para reação de cadeia da polimerase (PCR), Tri-Reagent[®] (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%) (Biotech, São Paulo, São Paulo, Brasil), heparina (Liquemine[®], Roche, São Paulo, São Paulo, Brasil), fosfato de sódio (Reagen, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de zinco (Vetec, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), Líquido de Türk, corante de May – Grünwald (Newprov, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), corante de Giemsa (Laborclin, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), azul de Evans (Acros-Organics, Nova Jersey, EUA); dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina (Merck, Darmstadt, Bundesland, Alemanha). Kits de enzimaímunoensaio (ELISA) para quantificação de TNF- α (BD – Biosciences Pharmingen, San Diego, Califórnia, EUA) e IL-1 β (RayBiotech Inch, Norcross, Georgia, EUA) de camundongos, Oligo-dT (12-18)[®], dNTPs e DNase grade I[®] (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), RevertAid[®] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit e Ribolock[®] (Fermentas, Burlington, Ontário, Canadá), Ludwig Biotec[®] SYBR Green qPCR mix 1:1 ROX (2x) (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil). Kits de enzimaímunoensaio (ELISA) para quantificação das proteínas p65 e p38 fosforilada (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA) e p38 MAPK total (Invitrogen, Camarillo, Califórnia, EUA). Acetona, clorofórmio, n-hexano, acetato de etila, metanol e etanol em grau de pureza analítica (PA) (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil). Outros sais e reagentes, de grau de pureza analítica, foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

4.15. Análise estatística

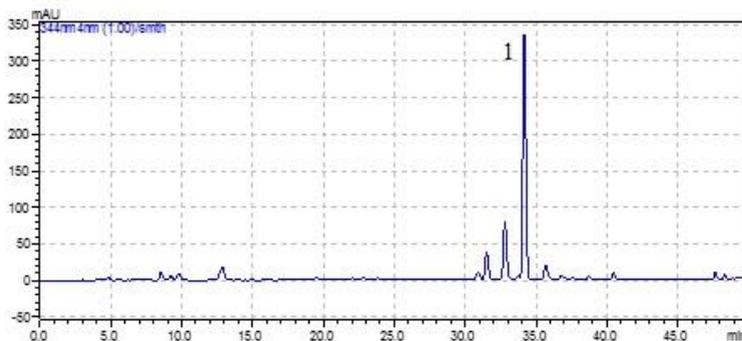
Os resultados dos parâmetros inflamatórios obtidos neste estudo, incluindo migração celular, exsudação, atividade das enzimas (MPO e ADA), bem como as concentrações de NO_x , citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), expressão de mRNA (TNF- α , IL-1 β e iNOS) e fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B e da proteína quinase ativada por mitógeno p38, foram expressos por média \pm erro padrão da média (e.p.m.). As diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e grupos tratados com o material vegetal ou com o fármaco de referência (Dexametasona) foram realizadas por meio do teste paramétrico de análise de variância (*one way*-ANOVA) complementado pelo teste post hoc de Newman-Keuls. Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® versão 5.0 (San Diego, Califórnia, EUA). Para todas as análises estatísticas, valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

5. Resultados

5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) do extrato bruto hidroalcoólico da *Polygala sabulosa*

O perfil cromatográfico do extrato bruto da *P. sabulosa* foi adquirido em comprimento de onda de 344 nm (**Figura 12**). Após a injeção de 20 μL do extrato bruto na concentração de 1 mg/mL, obteve-se um cromatograma com um pico de destaque referente ao composto majoritário 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC), com tempo de retenção de 34,17 minutos. A confirmação do referido pico como sendo o composto em questão foi realizada pela técnica de adição do padrão nas amostras testadas. Também foi realizada a injeção do composto isolado purificado e certificado (RMN C^{13} e H^1) em 5 concentrações diferentes, realizados em triplicata, com a finalidade de construção da curva de calibração para quantificação do mesmo no extrato. Após realização da curva, o composto foi quantificado no EBH e representou 178 mg/g (17,8%) do referido material vegetal.

Figura 12. Cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) da *Polygala sabulosa*

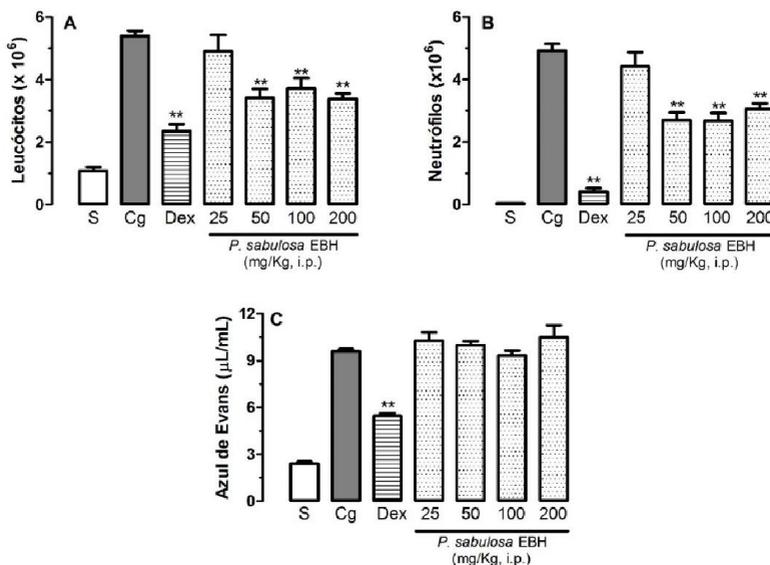


EBH (1 mg/mL) em $\lambda = 344 \text{ nm}$ (condições cromatográficas item 4.3). 1. Pico representando o composto 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC).

5.2. Efeito da *Polygala sabulosa* sobre a migração leucocitária e exsudação

O presente estudo foi capaz de comprovar que o EBH de *P. sabulosa* possui a capacidade de reduzir a migração leucocitária para a cavidade pleural, quando administrado nas doses de 50, 100 e 200 (mg/kg) comparado-se ao grupo controle positivo (Cg 1%) (% inibição: 50 mg/kg: $36,8 \pm 5,3$; 100 mg/kg: $31,1 \pm 6,2$ e 200 mg/kg: $37,8 \pm 3,4$) ($P < 0,01$) (**Figura 13 A**). Esta diminuição na migração leucocitária ocorreu principalmente pela capacidade do extrato em diminuir a migração de neutrófilos para a cavidade pleural (% inibição: 50 mg/kg: $45,1 \pm 5,1$; 100 mg/kg: $45,5 \pm 4,9$ e 200 mg/kg: $37,8 \pm 3,4$) ($P < 0,01$) (**Figura 13 B**). Nas doses testadas, o EBH não foi capaz de diminuir a exsudação na cavidade pleural dos camundongos ($P > 0,05$) (**Figura 13 C**).

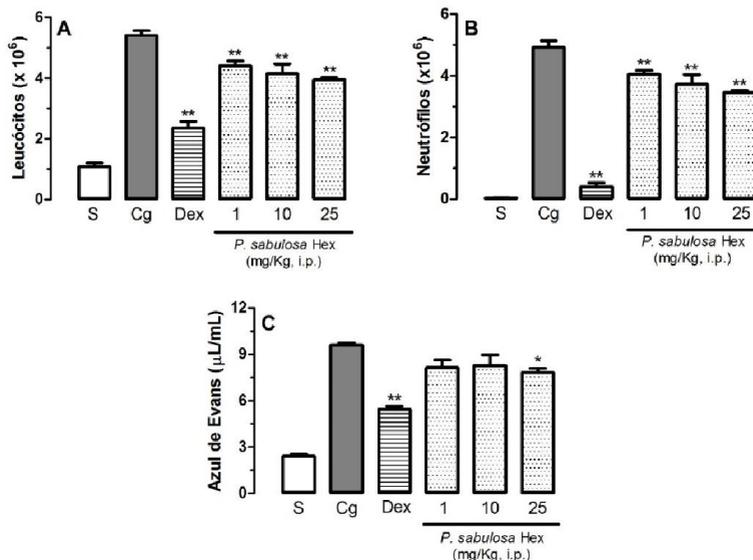
Figura 13. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) da *Polygala sabulosa* sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e exsudação (C)



Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) da *Polygala sabulosa* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle inflamado (Cg), n = 6 animais. ** P<0,01.

A fração Hex também reduziu significativamente o influxo de leucócitos para cavidade pleural (% inibição: 1 mg/kg: $18,5 \pm 3,0$; 10 mg/kg: $23,3 \pm 6,0$ e 25 mg/kg: $27,0 \pm 1,4$) (P<0,01) (Figura 14 A), e este efeito também se deve a sua capacidade em inibir a migração de neutrófilos (% inibição: 1 mg/kg: $17,9 \pm 2,6$; 10 mg/kg: $24,4 \pm 6,5$ e 25 mg/kg: $29,7 \pm 1,4$) (P<0,01) (Figura 14 B). Ao contrário do EBH, esta fração foi capaz de reduzir a concentração de exsudato na cavidade pleural quando administrada na dose de 25 mg/kg (% inibição: 25 mg/kg: $18,5 \pm 2,9$) (P<0,05) (Figura 14 C).

Figura 14. Efeito da fração hexânica (Hex) da *Polygala sabulosa* sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e exsudação (C)

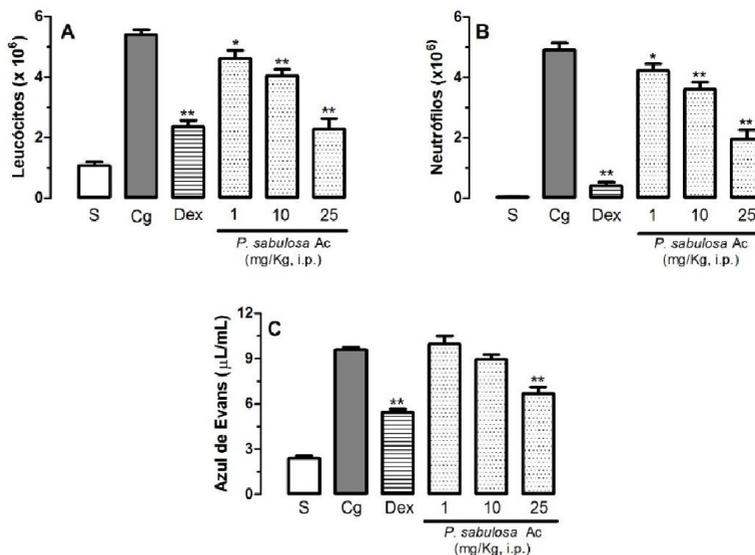


Efeito da fração hexânica (Hex) da *Polygala sabulosa* administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle inflamado (Cg), n = 6 animais. *P<0,05 e **P<0,01.

Nas mesmas condições, a fração Ac reduziu de forma significativa a migração leucocitária para a cavidade pleural nas doses de 1, 10 e 25 mg/kg (% inibição: 1 mg/kg: 15,9 \pm 3,6; 10 mg/kg: 25,2 \pm 4,0 e 25 mg/kg: 57,8 \pm 6,6) (P<0,05) (**Figura 15 A**). Este perfil inibitório novamente foi devido a diminuição na migração neutrofílica (% inibição: 1 mg/kg: 14,9 \pm 4,3; 10 mg/kg: 26,8 \pm 4,9 e 25 mg/kg: 60,2 \pm 6,0) (P<0,05) (**Figura 15 B**). Da mesma forma que a fração Hex, a fração Ac foi capaz de diminuir a concentração de exsudato na cavidade pleural apenas

quando administrada na dose 25 mg/kg (% inibição: 25 mg/kg: $30,3 \pm 4,5$) ($P < 0,01$) (**Figura 15 C**).

Figura 15. Efeito da fração acetonica (Ac) da *Polygala sabulosa* sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e exsudação (C)

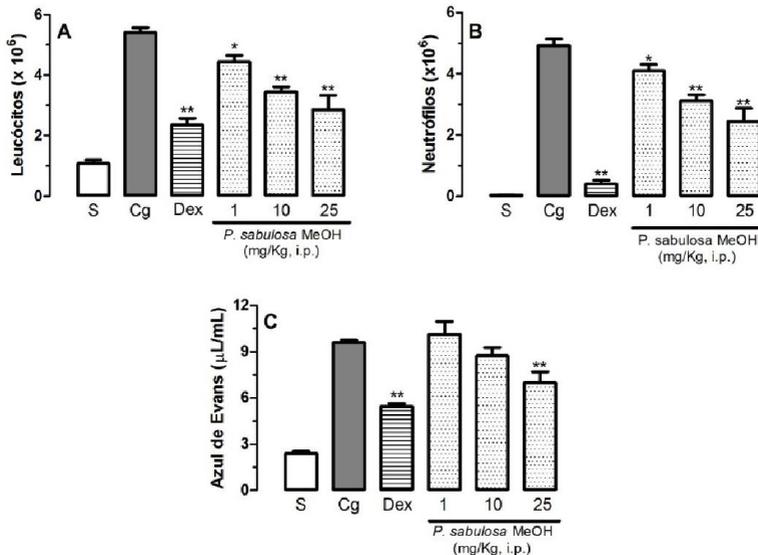


Efeito da fração acetonica (Ac) da *Polygala sabulosa* administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle inflamado (Cg), n = 6 animais. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

A fração MeOH também foi capaz de reduzir significativamente a migração leucocitária para a cavidade pleural (% inibição: 1 mg/kg: $17,8 \pm 3,8$; 10 mg/kg: $36,3 \pm 3,1$ e 25 mg/kg: $47,0 \pm 8,7$) ($P < 0,05$) (**Figura 16 A**), às custas, principalmente, da diminuição na migração de neutrófilos (% inibição: 1 mg/kg: $16,7 \pm 4,2$; 10 mg/kg: $36,6 \pm 4,0$ e 25 mg/kg: $50,4 \pm 8,9$) ($P < 0,05$) (**Figura 16 B**). Além disso, assim como observado com a fração Hex e Ac, essa fração também foi capaz de inibir

significativamente a concentração de exsudato na cavidade pleural quando administrada na dose de 25 mg/kg (% inibição: 25 mg/kg: $27,2 \pm 7,6$) ($P < 0,01$) (**Figura 16 C**).

Figura 16. Efeito da fração metanólica (MeOH) da *Polygala sabulosa* sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e exsudação (C)

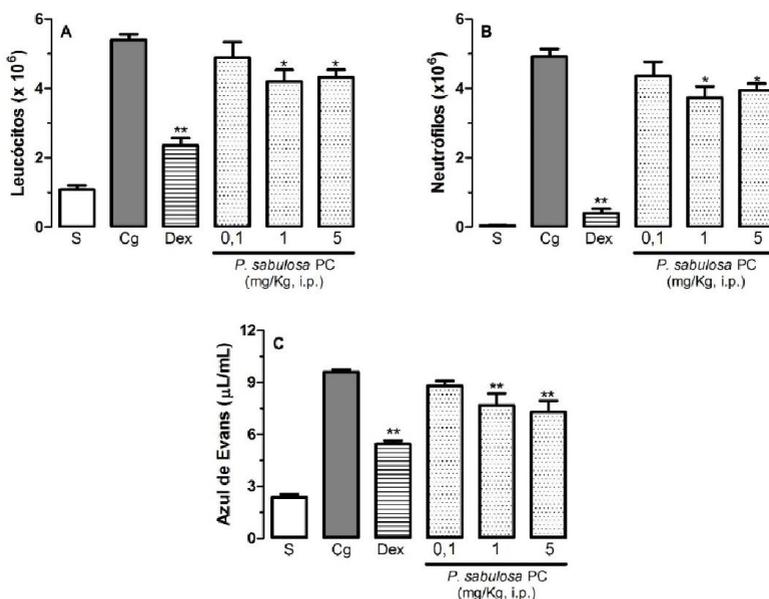


Efeito da fração metanólica (MeOH) da *Polygala sabulosa* administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle inflamado (Cg), n = 6 animais. *P < 0,05 e ** P < 0,01.

Finalmente, o composto isolado, PC, também apresentou um importante efeito anti-inflamatório sobre os mesmos parâmetros testados. O composto foi capaz de reduzir a migração leucocitária quando administrado nas doses de 1 e 5 mg/kg (% inibição: 1 mg/kg: $22,2 \pm 6,2$ e 5 mg/kg: $20,0 \pm 4,1$) ($P < 0,05$) (**Figura 17 A**), e este efeito inibitório

apresentou o mesmo perfil das outras frações testadas, principalmente pela capacidade de inibir a migração de neutrófilos para cavidade pleural (% inibição: 1 mg/kg: $24,3 \pm 6,8$ e 5 mg/kg: $20,0 \pm 4,1$) ($P < 0,05$) (**Figura 17 B**). Além disso, a exsudação também foi significativamente reduzida nestas mesmas doses (% inibição: 1 mg/kg: $19,9 \pm 7,1$ e 5 mg/kg: $24,0 \pm 6,8$) ($P < 0,01$) (**Figura 17 C**).

Figura 17. Efeito do composto isolado 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC) da *Polygala sabulosa* sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e exsudação (C)



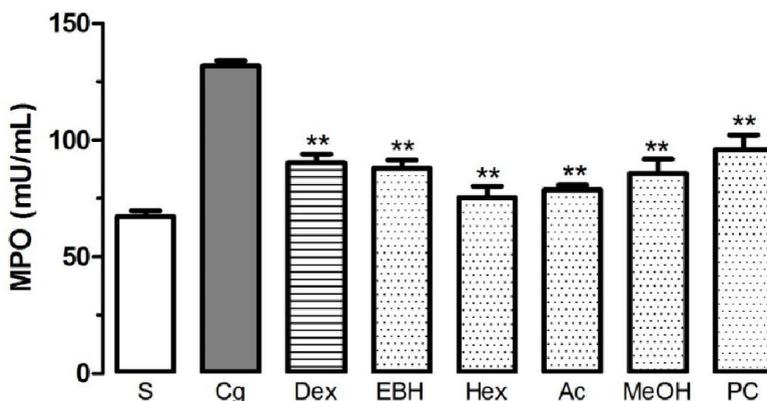
Efeito do composto isolado 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC) isolado da *Polygala sabulosa* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle inflamado (Cg), n = 6 animais. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Baseado nos resultados apresentados até então, as menores doses de EBH, Hex, Ac, MeOH e PC capazes de inibir significativamente os parâmetros testados até o momento (leucócitos totais, neutrófilos e/ou concentração de exsudato) foram as seguintes: EBH: 50 mg/kg, Hex: 25 mg/kg, Ac: 25 mg/kg, MeOH: 25 mg/kg e PC: 1 mg/kg administrados por via intraperitoneal (i.p.). Estas doses foram então utilizados nos experimentos seguintes.

5.3. Efeito da *Polygala sabulosa* sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

O EBH (50 mg/Kg) de *P. sabulosa*, as frações: Hex (25 mg/kg), Ac (25 mg/kg) e MeOH (25 mg/kg), assim como o composto majoritário, PC (1 mg/kg), inibiram significativamente a atividade da enzima MPO no lavado da cavidade pleural quando comparados com o grupo controle positivo (Cg 1%) (% inibição: EBH: $33,2 \pm 2,5$; Hex: $42,9 \pm 3,8$; Ac: $40,2 \pm 1,4$; MeOH: $34,9 \pm 4,7$ e PC: $27,2 \pm 4,9$) ($P < 0,01$) (**Figura 18**).

Figura 18. Efeito da *Polygala sabulosa* sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

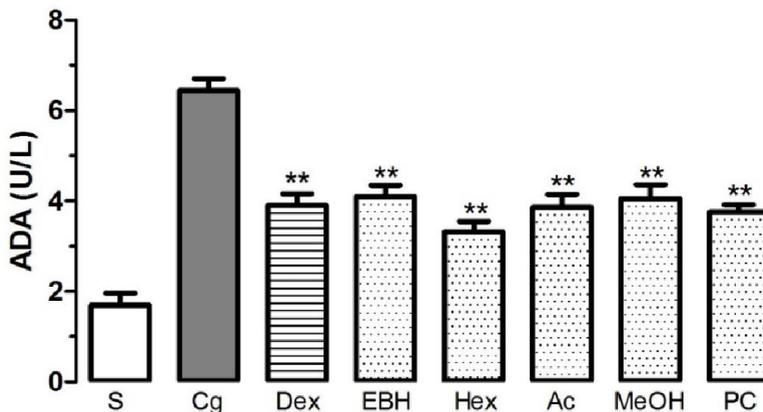


Efeito do EBH (50 mg/kg), frações: Hex (25 mg/kg), Ac (25 mg/kg) e MeOH (25 mg/kg) e composto isolado, PC (1 mg/kg), administrados i.p. 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle inflamado (Cg), n = 6 animais. ** P<0,01.

5.4. Efeito da *Polygala sabulosa* sobre a atividade da enzima adenosina-desaminase (ADA)

A atividade da enzima ADA na cavidade pleural também foi inibida pelo EBH (50 mg/kg), as frações: Hex (25 mg/kg), Ac (25 mg/kg) e MeOH (25 mg/kg), assim como pelo composto isolado, PC (1 mg/kg) (% inibição: EBH: $36,3 \pm 3,9$; Hex: $48,4 \pm 3,6$; Ac: $40,0 \pm 4,5$; MeOH: $36,9 \pm 4,7$ e PC: $41,6 \pm 2,6$) (P<0,01) (**Figura 19**).

Figura 19. Efeito da *Polygala sabulosa* sobre a atividade da enzima adenosina-deaminase (ADA)

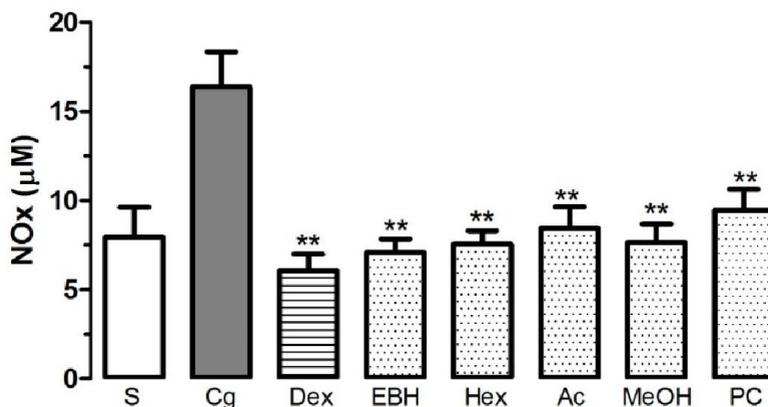


Efeito do EBH (50 mg/kg), frações: Hex (25 mg/kg), Ac (25 mg/kg) e MeOH (25 mg/kg) e composto isolado, PC (1 mg/kg), administrados i.p. 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle inflamado (Cg), n = 6 animais. ** P<0,01.

5.5. Efeito da *Polygala sabulosa* sobre as concentrações de nitrato e nitrito (NO_x)

O tratamento prévio dos animais com EBH (50 mg/kg), frações: Hex (25 mg/kg), Ac (25 mg/kg) e MeOH (25 mg/kg), assim como o composto majoritário, PC (1 mg/kg), reduziu de forma significativa as concentrações de metabólitos do óxido nítrico (NO_x) no lavado pleural (% inibição: EBH: $56,7 \pm 4,6$; Hex: $53,2 \pm 6,2$; Ac: $53,9 \pm 4,6$; MeOH: $48,3 \pm 7,2$ e PC: $42,1 \pm 7,0$) (P<0,01) (**Figura 20**).

Figura 20. Efeito da *Polygala sabulosa* sobre as concentrações de nitrito/nitrato

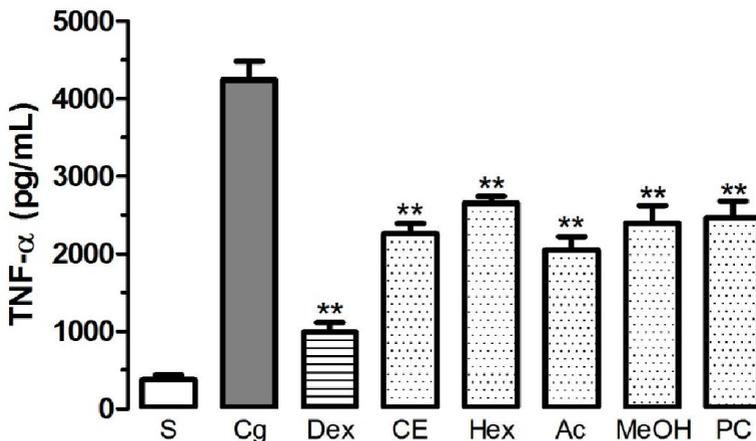


Efeito do EBH (50 mg/kg), frações: Hex (25 mg/kg), Ac (25 mg/kg) e MeOH (25 mg/kg) e composto isolado, PC (1 mg/kg), administrados i.p. 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle inflamado (Cg), n = 6 animais. ** P<0,01.

5.6. Efeito da *Polygala sabulosa* sobre a concentração de fator necrose tumoral alfa (TNF- α)

Os animais tratados com com EBH (50 mg/kg), suas frações derivadas: Hex (25 mg/kg), Ac (25 mg/kg) e MeOH (25 mg/kg), assim como o composto majoritário, PC (1 mg/kg), foram capazes de reduzir de forma significativa a concentração da citocina pró-inflamatória TNF- α no lavado pleural quando comparados com o controle positivo (Cg 1%) (% inibição: EBH: $46,8 \pm 3,2$; Hex: $37,5 \pm 2,1$; Ac: $51,7 \pm 4,1$; MeOH: $43,5 \pm 5,3$ e PC: $41,9 \pm 4,9$) (P<0,01) (**Figura 21**).

Figura 21. Efeito da *Polygala sabulosa* sobre as concentrações de TNF- α

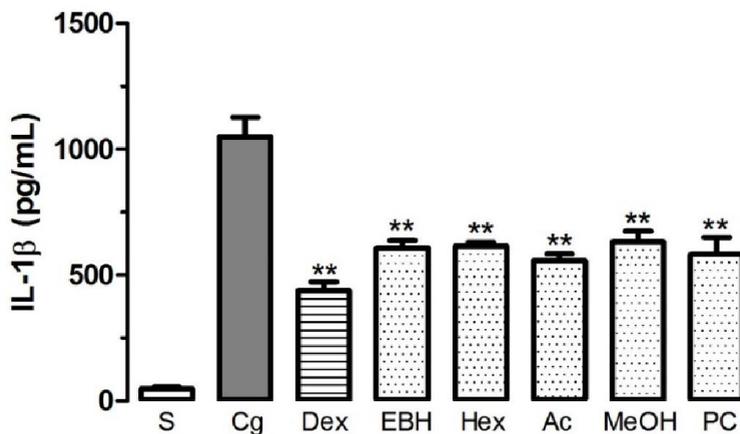


Efeito do EBH (50 mg/kg), frações: Hex (25 mg/kg), Ac (25 mg/kg) e MeOH (25 mg/kg) e composto isolado, PC (1 mg/kg), administrados i.p. 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle inflamado (Cg), n = 6 animais. ** P<0,01.

5.7. Efeito da *Polygala sabulosa* sobre a concentração de interleucina 1-beta (IL-1 β)

O perfil inibitório para a citocina pró-inflamatória TNF- α repetiu-se para a IL-1 β . Os resultados demonstraram que animais tratados com EBH (50 mg/kg), suas frações derivadas: Hex (25 mg/kg), Ac (25 mg/kg) e MeOH (25 mg/kg), assim como o composto majoritário, PC (1 mg/kg) foram capazes de reduzir de forma significativa a concentração desta citocina no lavado pleural (% inibição: EBH: 42,1 \pm 2,8; Hex: 41,4 \pm 1,3; Ac: 46,9 \pm 2,5; MeOH: 39,9 \pm 4,0 e PC: 44,6 \pm 6,5) (P<0,01) (Figura 22).

Figura 22. Efeito da *Polygala sabulosa* sobre as concentrações de IL-1 β



Efeito do EBH (50 mg/kg), frações: Hex (25 mg/kg), Ac (25 mg/kg) e MeOH (25 mg/kg) e composto isolado, PC (1 mg/kg), administrados i.p. 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle inflamado (Cg), n = 6 animais. ** P<0,01.

5.8. Efeito do composto isolado da *Polygala sabulosa*, 7-preniloxi-6-metoxicumarina, sobre a expressão de mRNA de TNF- α , IL-1 β e iNOS

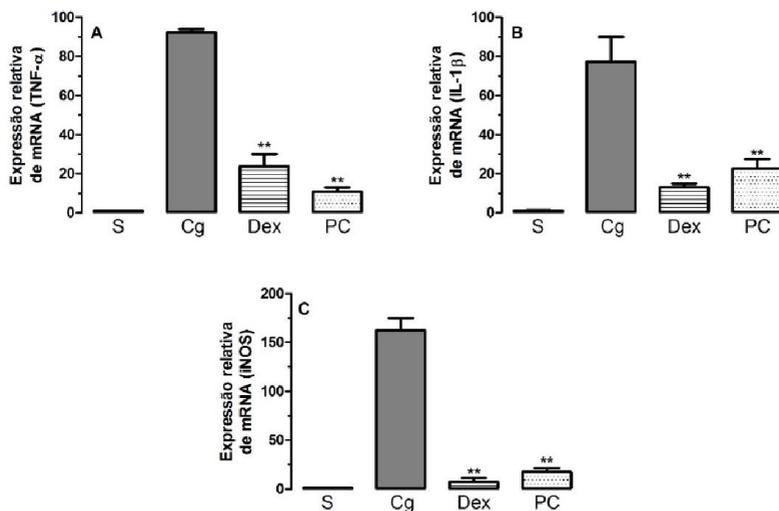
Uma vez que o composto majoritário isolado apresentou o mesmo perfil inibitório que o EBH e suas frações derivadas sobre todos os parâmetros inflamatórios analisados até o momento, podemos atribuir, pelo menos em parte, o efeito anti-inflamatório da planta a presença deste referido composto.

Desta forma, o próximo passo foi analisar se o composto isolado possui a habilidade de inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias e a enzima óxido nítrico sintase induzida a nível transcricional, ou se esse perfil inibitório sobre os marcadores inflamatórios verificado até o momento é relacionado a um fenômeno pós-transcricional. Com este

objetivo, foi realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) visando verificar a expressão do mRNA destes parâmetros (TNF- α , IL-1 β e iNOS).

Os resultados do RT-qPCR indicam que o composto isolado da *P. sabulosa*, PC (1 mg/kg, i.p.), possui a capacidade de reduzir a expressão de mRNA do TNF- α , IL-1 β e da iNOS induzido pela Cg, resultado que sugere que a redução na produção dos mediadores inflamatórios estudados se deu a nível transcricional (% inibição: mRNA TNF- α : 88,3 \pm 2,3; mRNA IL-1 β : 70,6 \pm 6,1 e mRNA iNOS: 89,2 \pm 2,5) (P<0,01) (Figura 23, A, B, C)

Figura 23. Efeito do composto isolado da *Polygala sabulosa* sobre a expressão de mRNA do TNF- α (A), IL-1 β (B) e iNOS (C)



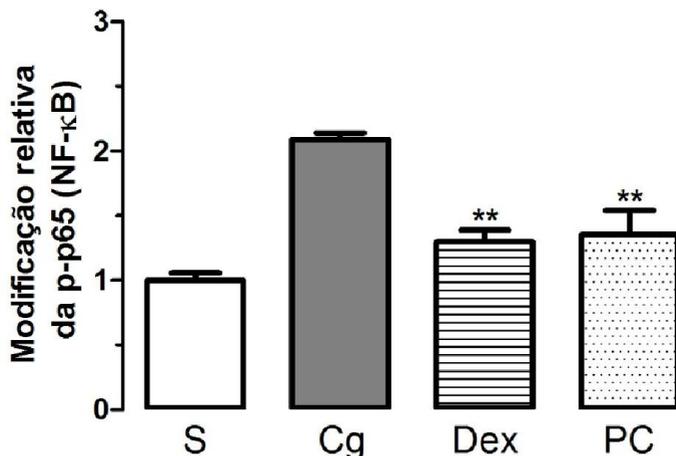
Efeito do composto isolado (PC) administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1 (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina), PC = animais previamente tratados com 7-preniloxi-6-metoxicumarina (1 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina). Expressão relativa do mRNA foi obtida por meio da metodologia do $2^{-\Delta\Delta CT}$. As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas em relação ao controle inflamado (Cg), n = 6 animais. ** P<0,01.

5.9. Efeito do composto isolado da *Polygala sabulosa*, 7-preniloxi-6-metoxicumarina, sobre a fosforilação da proteína p65 (NF- κ B)

A partir do momento que os resultados demonstraram que o composto isolado, 7-preniloxi-6-metoxicumarina, possuía a capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e a óxido nítrico sintase induzida a nível transcripcional, o próximo passo foi verificar o efeito deste composto sobre a ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), mais especificamente a fosforilação da subunidade p65. O NF- κ B é um fator de transcrição de suma importância para que o processo inflamatório seja desencadeado, sendo o principal fator de transcrição responsável pela síntese de TNF- α , IL-1 β e iNOS, além de diversos outros mediadores pró-inflamatórios (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011; DIAMANT; DIKSTEIN, 2013).

Nestes experimentos, os resultados obtidos demonstraram que PC (1 mg/kg) administrado por via intraperitoneal possui a capacidade de inibir de forma significativa a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B induzida pela Cg (% inibição: $35,2 \pm 8,8$) ($P < 0,01$) (**Figura 24**).

Figura 24. Efeito do composto isolado da *Polygala sabulosa* sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B



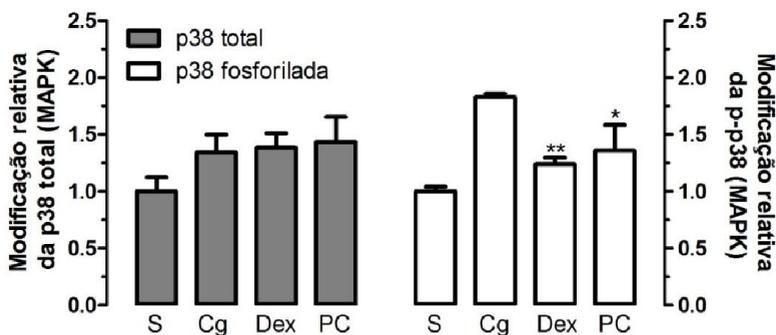
Efeito do composto isolado (PC) administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1 (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina), PC = animais previamente tratados com 7-preniloxi-6-metoxicumarina (1 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina). Os resultados foram expressos como modificação relativa em comparação com o grupo Salina (S), que representa a fosforilação basal da proteína p65. As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas em relação ao controle inflamado (Cg), n = 6 animais. ** P<0,01.

5.10. Efeito do composto isolado da *Polygala sabulosa*, 7-preniloxi-6-metoxicumarina, sobre a fosforilação da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK)

Assim como o NF- κ B, a proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) também exerce função importante na sinalização intracelular, culminando na síntese de diversos mediadores pró-inflamatórios. Esta MAPK também possui a capacidade de regular a síntese de TNF- α e IL-1 β , e outros mediadores pró-inflamatórios envolvidos na resposta inflamatória.

Neste protocolo experimental, a fosforilação da proteína p38 (p-p38) foi significativamente reduzida pelo composto isolado, PC (1 mg/kg, i.p.) (% inibição $25,5 \pm 12,4$) ($P < 0,05$) (**Figura 26**). Por outro lado, a concentração total da proteína p38 MAPK não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais estudados ($P > 0,05$) (**Figura 25**). Desta forma, podemos concluir que o composto isolado possui a capacidade de inibir a fosforilação sem alterar a síntese desta MAPK.

Figura 25. Efeito do composto isolado da *Polygala sabulosa* sobre a p38 MAPK total e fosforilada



Efeito do composto isolado (PC) administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1 (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina), PC = animais previamente tratados com 7-preniloxi-6-metoxicumarina (1 mg/kg, i.p.; 0,5 h antes da administração da carragenina). Os resultados foram expressos em modificação relativa em comparação com o grupo Salina (S) que representa a concentração basal da p38 total (p38) e a fosforilação basal da p38 fosforilada (p-p38). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas em relação ao controle inflamado (Cg), $n = 6$ animais. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

6. Discussão

No presente estudo, demonstramos as propriedades anti-inflamatórias do extrato bruto hidroalcoólico (EBH), fração hexânica (Hex), acetônica (Ac), metanólica (MeOH) e do composto majoritário isolado, 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC), da planta *Polygala sabulosa* A.W. Bennett. Esta afirmativa deveu-se à capacidade dos materiais vegetais estudados e composto isolado serem capazes inicialmente de inibir a migração de leucócitos e a formação de exsudato na cavidade pleural dos camundongos quando submetidos ao modelo da pleurisia induzida pela carragenina. Este modelo é de extrema utilidade para triagem de novos fármacos e substâncias com possível efeito anti-inflamatório, particularmente os derivados de produtos naturais. O mesmo possui um perfil bimodal (4 e 48 horas) e, em sua primeira fase (4 horas), o modelo é caracterizado pelo aumento da exsudação e pela massiva migração leucocitária para a cavidade pleural, sendo na sua grande maioria neutrófilos ativados, perfil característico da resposta imune inata ou natural. Já a segunda fase deste modelo (48 horas), caracteriza-se por um aumento ainda maior tanto na exsudação como na infiltração leucocitária, porém nesta fase os leucócitos presentes na cavidade pleural são, em sua grande maioria, mononucleares, agora perfil característico do estabelecimento da resposta imune adaptativa ou adquirida (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; CHAPLIN, 2010).

O estudo da primeira fase (4 h) deste modelo não se encaixa nos critérios de um modelo específico que mimetize a asma neutrofílica humana, porém a resposta inflamatória desencadeada pela carragenina expressa várias características essenciais desta doença, tais como a migração e ativação massiva de neutrófilos para a cavidade pleural, liberação de mediadores inflamatórios, como óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, aumento na atividade da MPO e ADA, ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B e ativação de inúmeras cascatas de sinalização intracelular como a p38 MAPK, além de importantes modificações histológicas presentes também na asma neutrofílica (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; LOKUTA; HUTTENLOCHER, 2005; DALMARCO; FRODE, 2007; ITO et al., 2008).

No processo inflamatório agudo, inicialmente ocorre a ativação de células envolvidas na resposta de fase aguda, como os neutrófilos. Esta ativação promove a produção e liberação, pelos próprios neutrófilos e também por células residentes no tecido afetado de diversos mediadores

inflamatórios, alguns deles já pré-formados, tais como: aminas vasoativas (histamina e serotonina), mediadores derivados de lipídeos (prostanoides e leucotrienos), mediadores peptídicos (bradicinina, taquicininas e endotelinas), proteases, entre outros, além de mediadores que têm sua produção estimulada, tais como: IL-1 β , TNF- α , IL-6, quemocinas, NO, espécies reativas do oxigênio entre outros (BARNES; CHUNG; PAGE, 1998; ANTONIOLI et al., 2012; OLZA et al., 2012).

Atualmente sabe-se que a produção excessiva de mediadores exerce papel de destaque em diversos processos inflamatórios tanto agudos como crônicos. Exemplos são as pneumonias e a asma brônquica, pelo qual se observa aumento significativo na produção de mediadores inflamatórios como o NO, IL-1 β e o TNF- α (ASHUTOSH, 2000; HANSBRO; KAIKO; FOSTER, 2011). Além disso, em outras doenças de caráter inflamatório, como o diabetes tipo 1, a aterosclerose e as doenças neurodegenerativas, também observa-se o descontrole na produção e liberação de tais mediadores, promovendo ativação de células presentes no sítio inflamatório além de causar a quimiotaxia de outras células presentes na corrente sanguínea (KING, 2008; PACKARD; LIBBY, 2008; AMOR et al., 2014). Por este motivo, o controle na produção/liberação dos mediadores inflamatórios, tem surgido como opção terapêutica para que ocorra diminuição na severidade da lesão tecidual. Além disso, sabe-se que esta desregulação na produção e liberação de mediadores inflamatórios, além de exercer papel fundamental em diversas doenças, parece estar diretamente relacionada à severidade, extensão e cronicidade de doenças inflamatórias como ocorre na colite ulcerativa, na esclerose múltipla e na doença pulmonar obstrutiva crônica (STOYANOVA; GULUBOVA, 2002; BARNES, 2004; KHADEMI et al., 2009).

Neste contexto, os resultados obtidos em nossos experimentos demonstraram que o EBH, as frações e composto isolado PC da *P. sabulosa* possuem um perfil anti-inflamatório similar ao serem capazes de inibir a migração de leucócitos e a exsudação para a cavidade pleural na primeira fase (4 horas) da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Com exceção do EBH, que não foi capaz de reduzir significativamente a formação de exsudato na cavidade pleural em nenhuma das doses testadas. A habilidade da *P. sabulosa* em inibir o influxo leucocitário para a cavidade pleural, verificada em nossos experimentos, foi acompanhada da capacidade desta planta em inibir de forma significativa a migração de neutrófilos. Este fato nos permite concluir que a inibição da migração de leucócitos ocorreu pela capacidade

da planta em reduzir a migração de neutrófilos. Esse mesmo perfil inibitório verificado em nossos experimentos, foi também observado por BORGES et al. (2014) que demonstraram em seus experimentos uma redução significativa no influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal quando camundongos foram tratados com a *P. sabulosa* no modelo de peritonite induzida por LPS, e esse efeito também foi atribuído a habilidade desta planta em reduzir a migração neutrofílica (BORGES et al., 2014). A inibição da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, um resultado importante verificado em nossos experimentos, pode ter sido devido a capacidade da planta de interferir em diversos mecanismos envolvidos no processo inflamatório. Com destaque para a redução na expressão de moléculas de adesão sabidamente responsáveis por transportar estas células da corrente sanguínea para o tecido inflamado, e/ou também por ser capaz de reduzir de forma significativa a produção de mediadores inflamatórios quimiotáticos para estas células (SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Quanto a primeira hipótese, não existem estudos até o momento que tenham utilizado alguma espécie de *Polygala* e que tenha verificado tal possibilidade. Por outro lado, existem alguns relatos experimentais sobre a inibição na produção de mediadores inflamatórios diretamente ligados a migração de neutrófilos ao sítio inflamado, como é o caso do estudo citado anteriormente e conduzido por BORGES et al. (2014) onde foi verificado redução na produção de diversos mediadores inflamatórios como a IL-1 β e o TNF- α , diretamente ligada a inibição na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (BORGES et al., 2014). Outro estudo, utilizado o modelo da pleurisia induzida pela carragenina, demonstrou esta mesma afirmativa quando os camundongos foram tratados com outra espécie de *Polygala* (*P. mollungilifolia*) (ARRUDA-SILVA et al., 2014).

Embora a carragenina seja um polissacarídeo sulfatado diferente do LPS, ela também possui a capacidade de ativar a resposta imune através de sua ligação com receptores do tipo TLR4 presentes em células do sistema imune inato, assim como o próprio LPS (DONG et al., 2006; BHATTACHARYYA; DUDEJA; TOBACMAN, 2008). Além disso, a inibição no influxo neutrofílico para a cavidade pleural causada pela *P. sabulosa* foi acompanhada pela redução na atividade da enzima MPO. Esta enzima é utilizada como marcador de neutrófilos ativados e está presente nos grânulos citoplasmáticos deste tipo celular. Ainda, a MPO é em parte responsável pela formação de EROs com intuito de destruir agentes lesivos. Porém a produção e liberação exagerada desta enzima em processos inflamatórios acaba cooperando para a lesão de tecidos

saudáveis (KLEBANOFF, 2005; DAVIES, 2011). Atualmente sabe-se que esta enzima, através da formação de seus produtos primários e/ou secundários, está envolvida no desenvolvimento de diferentes processos patológicos, com destaque para doenças de caráter inflamatório como a aterosclerose, a glomeruloesclerose e doenças do trato respiratório. Sendo assim, vem ganhando papel de destaque como alvo de estudos para o desenvolvimento de novos fármacos que possuam ação inibitória sobre sua atividade (MALLE et al., 2007; CHURG et al., 2012; FORBES et al., 2013). Mais recentemente, pesquisas têm sido desenvolvidas no intuito de utilizar e validar a determinação da atividade da MPO como marcador de severidade de doenças inflamatórias pulmonares, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), caracterizada pelo acentuado perfil inflamatório neutrofílico (PARK et al., 2013; ZHU et al., 2014). Embora não existam até o momento estudos que demonstrem a capacidade da *P. sabulosa* em diminuir a atividade desta enzima, ARRUDA-SILVA et al. (2014) demonstraram a ação inibitória sobre a atividade da MPO por outra espécie do gênero *Polygala* (*P. molluginifolia*), quando testada também no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos (ARRUDA-SILVA et al., 2014). Neste mesmo sentido, observamos que o efeito inibitório do extrato bruto hidroalcoólico e frações sobre a MPO, foi mantido quando testamos isoladamente a cumarina 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC), composto majoritário presente na *P. sabulosa*. Embora não existam relatos na literatura sobre a inibição da MPO pelo composto PC, a ação inibitória das cumarinas sobre a MPO já foi descrita, exemplo disso foi o estudo desenvolvido por YAO et al. (2012), que utilizando um modelo *in vivo* de inflamação induzida por cristais de urato monossódico em camundongos (*air pouch*), demonstraram que a cumarina escopoletina possui a capacidade de inibir de forma significativa a atividade da enzima MPO na bolsa de ar destes animais (YAO et al., 2012).

A *P. sabulosa* demonstrou capacidade de inibir também a atividade da ADA, enzima responsável pelo processo de desaminação da adenosina que por sua vez pode exercer ação anti-inflamatória. A habilidade em diminuir a atividade desta enzima pela *P. sabulosa* acaba por manter as concentrações fisiológicas de adenosina, que possui ação anti-inflamatória nos pulmões (BLACKBURN et al., 2009). Ainda, quando ligada a receptores A2a e A3 a adenosina gera uma importante redução na capacidade de neutrófilos em se aderir a células endoteliais consequentemente reduzindo o influxo neutrofílico para o local da inflamação, neste caso a cavidade pleural (ANTONIOLI et al., 2014).

Levando em consideração seu íntimo envolvimento nas células do sistema imune, protótipos de medicamentos com ação inibitória sobre as atividades desta enzima vem sendo pesquisados nos últimos anos (CRISTALLI et al., 2001; ANTONIOLI et al., 2012). Vale lembrar que a atividade da ADA no escarro pulmonar já é rotineiramente utilizada como ferramenta para auxiliar no diagnóstico da tuberculose e recentemente pesquisas apontaram seu valor no diagnóstico desta doença quando aferida sua atividade também no soro (AFRASIABIAN et al., 2013). Novamente, nenhum estudo até o momento desenvolveu experimentos com intuito de avaliar a atividade da *P. sabulosa* sobre a ADA. Porém, ARRUDA-SILVA et al. (2014) avaliaram a capacidade de outra espécie de *Polygala* (*P. molluginifolia*) também sobre atividade desta enzima, constatando que a *P. molluginifolia* possui ação inibitória sobre esta enzima, no modelo de pleurisia induzida pela carragenina (ARRUDA-SILVA et al., 2014).

A formação de exsudato, outro importante sinal do estabelecimento do processo inflamatório, está intimamente relacionado com o aumento das concentrações de NO, sendo este gás solúvel resultado da ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) presente tanto em células endoteliais quanto em células inflamatórias (BARNES, 1995; SUSCHEK; SCHNORR; KOLB-BACHOFEN, 2004; LECHNER; LIRK; RIEDER, 2005; LUIKING; ENGELEN; DEUTZ, 2010). As três isoformas hoje conhecidas desta enzima são a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS1), a óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS2) e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS3) (GHOSH; ERZURUM, 2011). Tanto a eNOS quanto a nNOS são isoformas constitutivas, ou seja, possuem maior relação com processos fisiológicos para manter a homeostase do organismo. Diferente destas duas isoformas, a iNOS é, como próprio nome a descreve, uma enzima passível de indução, ativada pela liberação de mediadores inflamatórios, tais como algumas citocinas pró-inflamatórias (POBER; SESSA, 2007). Neste contexto, os nossos resultados demonstram que os produtos naturais derivados da *P. sabulosa* (EBH, frações e PC) foram capazes de reduzir significativamente o exsudato e as concentrações de NO na cavidade pleural, ao mesmo tempo que o composto isolado, PC, foi capaz de inibir a expressão do mRNA para a iNOS, principal responsável pela produção exacerbada de NO durante o processo inflamatório deflagrado pela carragenina (AKTAN, 2004). Analisando outras espécies de *Polygala*, WANG et al. (2008) demonstraram que animais tratados com *Polygala japonica* tiveram redução significativa na formação de edema em modelo

de edema de pata induzido pela carragenina em camundongos (WANG et al., 2008). Além disso, CHO et al. (2012) observaram um perfil de inibição similar sobre as concentrações de NO e expressão de mRNA da iNOS quando constituintes da raiz de *Polygala tenuifolia* foram testados em células de micróglia murina BV-2 estimuladas com LPS (CHO et al., 2012). Outro estudo, conduzido *in vivo*, também com outra espécie de *Polygala* (*P. molluginifolia*), demonstrou o mesmo perfil inibitório sobre as concentrações de exsudato e NO no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos (ARRUDA-SILVA et al., 2014). Curiosamente, o EBH da *P. sabulosa* não foi capaz de reduzir o exsudato em nenhuma das doses testadas, embora tenha demonstrado um perfil inibitório significativo sobre as concentrações de NO. Fato este que sugere e corrobora com evidências de que o processo de formação de exsudato pode ser mediado também por outros fatores, como o aumento da síntese de prostanóides por exemplo.

Em síntese, os prostanóides são autocóides lipídicos derivados do ácido aracádônico e são capazes de exercer funções com fins homeostáticos como mediar mecanismos patogênicos, incluindo neste caso a inflamação. Para que sejam gerados os prostanóides a liberação de ácido aracádônico da membrana plasmática mediado por ação de fosfolipases deve ocorrer, seguida da metabolização deste ácido pela ação das enzimas ciclooxigenases (COX). A este grupo de autacóides pertencem as prostaglandinas, as prostaciclina e os tromboxanos (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Neste sentido, OGINO et al. (2000) demonstraram que no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em ratos, os prostanóides tem um importante papel na formação de exsudato (OGINO et al., 2000). Também, YUHKI et al. (2004) demonstraram que os receptores de prostaglandinas EP2, EP3 e IP quando ativados são também importantes para a formação de exsudato no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos (YUHKI et al., 2004).

Durante o estabelecimento da inflamação as células inflamatórias envolvidas neste processo são capazes de produzir e liberar no meio extracelular proteínas sinalizadoras conhecidas como citocinas. As citocinas, secretadas por diferentes populações celulares, tem como principal função sinalizar fenômenos entre as células podendo agir na própria célula que a secretou (ação autocrina), em células próximas (ação paracrina) ou algumas vezes em células distantes (ação endócrina). As citocinas são redundantes em suas atividades, ou seja, funções similares podem ser exercidas por diferentes citocinas além de poderem agir também de forma sinérgica ou antagonica. Na inflamação, na grande

maioria das vezes, as citocinas secretadas tem como função recrutar mais células para o sítio do processo inflamatório (ZHANG; AN, 2007; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). Embora existam também citocinas com perfil anti-inflamatório como a IL-10 e o TGF- β (SANJABI et al., 2009; BAZZONI et al., 2010).

Além da migração massiva de neutrófilos, a formação de exsudato, e do aumento nas atividades de MPO e ADA e nas concentrações de NO, o modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos ainda é caracterizado pelo grande aumento na produção das citocinas caracterizadas como pró-inflamatórias (FRODE; MEDEIROS, 2001; IMPELLIZZERI et al., 2011). Dentre as citocinas pró-inflamatórias podemos destacar o TNF- α e a IL-1 β por sua importância em diferentes doenças de caráter inflamatório. Ambas as citocinas estão envolvidas em fenômenos de recrutamento de diferentes populações de leucócitos tendo a capacidade de induzir o aumento na expressão de moléculas de adesão, além de participarem de outros processos que desencadeiam a inflamação. Além disso, estas citocinas tem um envolvimento íntimo com as vias de sinalização tanto do NF- κ B como das MAPKs (BRADLEY, 2008; GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010). Embora diversas citocinas estejam envolvidas no desenvolvimento e estabelecimento da inflamação, sabe-se que o TNF- α e a IL-1 β tem um papel central neste fenômeno principalmente quando a resposta imune inata é proeminente, incluindo a resposta inflamatória presente no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos (FRODE; SOUZA; CALIXTO, 2001).

Em nossos experimentos, a síntese e liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β induzida pela Cg também foram significativamente reduzidas em animais tratados com *P. sabulosa*. A indução da síntese de TNF- α e IL-1 β , neste modelo, é principalmente desencadeada pela ação da carragenina sobre TLR4, que por sua vez ativa diferentes vias de sinalização intracelulares como a via canônica do NF- κ B e a via da p38 MAPK. Estas vias acabam por estimular a síntese de mRNA específicos para estas mesmas citocinas e, conseqüentemente, aumentam sua produção pelas células (BHATTACHARYYA; DUDEJA; TOBACMAN, 2008; OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011). Os resultados na inibição das citocinas TNF- α e IL-1 β pelo tratamento dos animais com material vegetal de *P. sabulosa*, são corroborados por BORGES et al. (2014) que, no modelo *in vivo* de peritonite induzida por LPS em camundongos, demonstraram a capacidade do extrato hidroalcoólico desta mesma espécie em inibir as concentrações de TNF- α e IL-1 β (BORGES et al., 2014). Ainda, CHEONG et al. (2011)

demonstraram que o extrato aquoso das raízes de *Polygala tenuifolia* possui a capacidade de diminuir a geração destas duas citocinas pró-inflamatórias em um modelo *in vitro* de células de micrógliia murina BV-2 estimuladas com LPS (CHEONG et al., 2011). Outra espécie deste mesmo gênero, a *Polygala senega*, apresentou a capacidade de inibir as concentrações de TNF- α e IL-1 β quando o decoto de suas raízes foi testado no modelo *in vitro* de macrófagos murinos RAW 164.7 induzidos com LPS (VAN et al., 2009). Além disso, segundo KIM et al. (2004) a cumarina escopoletina, composto químico da mesma família que a PC isolada da *P. sabulosa*, também diminuiu as concentrações de TNF- α e IL-1 β em modelo *in vitro* de células RAW 264.7 induzidas por LPS (KIM et al., 2004).

O NF- κ B é o fator de transcrição mais conhecido no processo inflamatório, sendo ele responsável por induzir a transcrição do mRNA de diversos mediadores pró e anti-inflamatórios, inclusive de TNF- α , IL-1 β e iNOS. A família deste fator de transcrição é composta por cinco diferentes subunidades proteicas (p65, RelB, c-Rel, p50 e p52), sendo que o fator em si apresenta-se na forma de dímeros. Destes dímeros o com maior destaque e ação em processos inflamatórios é o heterodímero p65/p50. (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011; DIAMANT; DIKSTEIN, 2013). Existem duas distintas vias de sinalização para ativação de diferentes dímeros do NF- κ B. Através da via não canônica, por exemplo, receptores específicos para citocinas da família do TNF (exceto o TNF- α) estimulam a fosforilação da proteína IKK α sendo esta proteína responsável pelo processamento do dímero RelB/p100 em RelB/p52. Após o processamento este dímero transporta-se para o núcleo onde exerce suas funções específicas como fator de transcrição. Já na via canônica, o dímero RelA/p50 (p65/p50) é ativado. Para que ocorra a ativação do heterodímero p65/p50 do NF- κ B um estímulo extracelular (PAMPs, DAMPs, citocinas, entre outros) deve ativar, através de sua ligação com receptores de membrana, o complexo proteico IKK o qual é composto por três diferentes proteínas: o IKK α , o IKK β e a IKK γ (NEMO). Na via canônica o IKK β é fosforilado e é responsável pela posterior fosforilação da proteína inibitória do heterodímero p65/p50, a I κ B α . A I κ B α então fosforila a subunidade p65 do NF- κ B e é degradada através de um proteossoma. Uma vez livre o NF- κ B é translocado para o núcleo onde estará disponível para transcrever informações para que o processo inflamatório seja modulado (VIATOUR et al., 2005; LAWRENCE, 2009; HAYDEN; GHOSH, 2012).

Neste contexto, os resultados obtidos em nossos experimentos sugerem que a *P. sabulosa* exerce seu efeito anti-inflamatório, em parte, pela habilidade de seu composto isolado, PC, em inibir a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B, o que justificaria a redução na produção de mediadores inflamatórios verificada em nossos experimentos. Esta mesma evidência também foi observada por CHEONG et al. (2011) que demonstraram que o extrato aquoso das raízes de *P. tenuifolia* é capaz de atenuar a liberação de TNF- α , IL-1 β e NO por células da micrógliia, e esse efeito foi atribuído principalmente a inibição da ativação do NF- κ B (CHEONG et al., 2011). Além disso, KHAN et al. (2011) relataram que a piranocumarina anomalina, composto químico da mesma classe do composto majoritário da *P. sabulosa*, apresenta capacidade de inibir a ativação do NF- κ B em modelo *in vitro* de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (KHAN et al., 2011). Ainda, KIM et al. (2013) demonstraram em modelo de macrófagos RAW 264.7 e macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS, que um dos compostos isolados da *P. tenuifolia*, o tenuifoliside A, é capaz de inibir a translocação do NF- κ B para o núcleo através da inibição da sua fosforilação e consequente não degradação de sua proteína inibitória, a I κ B α (KIM et al., 2013).

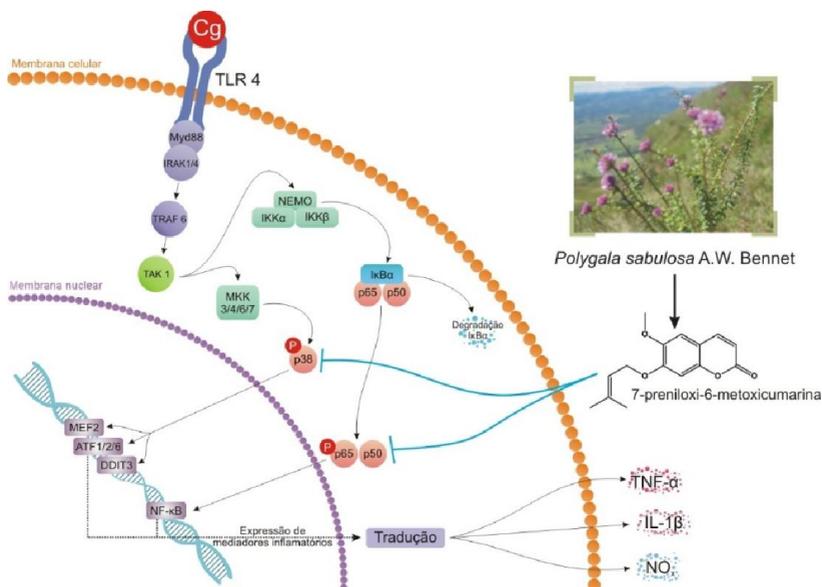
Como citado anteriormente, a quinase p38 MAPK também é responsável por induzir a ativação de diversas proteínas intracelulares e fatores de transcrição que participam ativamente durante o processo inflamatório. A via das MAPKs é hoje uma das vias intracelulares mais estudadas por participar de diversos processos tanto fisiológicos como patológicos, além de estar presente em praticamente todas as células do organismo. As MAPKs funcionam em forma de cascata e podem ser divididas em quatro principais subfamílias, sendo elas as ERKs, as BMK1, as JNKs e as p38. Para que ocorra ativação destas proteínas intracelulares um estímulo extracelular deve ocorrer, a partir disso a fosforilação de diversas quinases ocorrem até que as MAPKs sejam finalmente ativadas (CARGNELLO; ROUX, 2011). Cada uma das quatro famílias das MAPKs está envolvida em diferentes processos embora alguns processos dependam da co-ativação destas proteínas. Neste sentido, a p38 é a MAPK com maior importância no processo inflamatório uma vez que esta MAPK ativa proteínas e fatores de transcrição que atuam como moduladores da produção de citocinas e/ou do recrutamento de leucócitos e aumento de suas sobrevividas no sítio inflamatório (ASHWELL, 2006). A p38 pode, por exemplo, ativar proteínas responsáveis por modular a estabilidade e tradução do mRNA

de citocinas pró-inflamatórias, além de estar diretamente relacionada a ativação de fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação e proliferação celular (ZARUBIN; HAN, 2005; WHITMARSH, 2010). Analisando nossos resultados verificamos que o composto isolado da *P. sabulosa* é, se não o responsável, um dos mais importantes motivos para que a planta estudada possua capacidade de inibir a ativação da cascata p38 MAPK, e conseqüentemente reduzir de forma significativa a síntese de importantes mediadores pró-inflamatórios. Resultados similares neste sentido também foram verificados nos experimentos conduzidos por KIM et al. (2013), onde foi demonstrado que outra espécie de *Polygala*, a *P. tenuifolia*, exerce função regulatória sobre a inflamação através da inibição da fosforilação da JNK MAPK, uma proteína reguladora de diversos processos fisiológicos da mesma família que a p38 MAPK (KIM et al., 2013). Além disso, em experimentos *ex vivo*, DOU et al. (2013) demonstraram que a Escopoletina, outra cumarina natural, é a principal responsável em reduzir o processo inflamatório induzido pela IL-1 β em sinoviócitos isolados de ratos, sendo este efeito gerado em parte a partir da inibição da fosforilação da p38 MAPK e sua conseqüente ativação (DOU et al., 2013).

7. Conclusão

Os resultados apresentados corroboram a afirmação que, como outras espécies de *Polygala*, a *P. sabulosa* apresenta um importante efeito anti-inflamatório e, além disso, nos permite hipotetizar o principal mecanismo de ação desta planta para que exerça este efeito. Em síntese, a ação sobre as cascatas de sinalização do NF- κ B e da p38 MAPK parece ser, pelo menos em parte, o mecanismo de ação do composto majoritário 7-preniloxi-6-metoxicumarina da espécie *P. sabulosa*. Este fato justifica sua capacidade em inibir a migração leucocitária e a produção e liberação de importantes mediadores inflamatórios no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos (**Figura 26**).

Figura 26. Resumo gráfico da proposta para o mecanismo de ação da 7-preniloxi-6-metoxicumarina (PC), composto isolado da *Polygala sabulosa*.



A ação da 7-preniloxi-6-metoxicumarina, composto majoritário da *P. sabulosa*, sobre as cascatas de sinalização do NF- κ B e da p38 MAPK parece ser, pelo menos em parte, o mecanismo responsável por sua ação anti-inflamatória. Fonte: Elaborado pelo autor.

Referências

- AFRASIABIAN, S. et al. Diagnostic value of serum adenosine deaminase level in pulmonary tuberculosis. **J Res Med Sci**, v. 18, n. 3, p. 252-4, 2013.
- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sci**, v. 75, n. 6, p. 639-53, 2004.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 5. New York: Garland Science, 2007. ISBN 9780815341055.
- ALI, M. et al. Anti-inflammatory xanthenes from the twigs of *Hypericum oblongifolium* wall. **Planta Med**, v. 77, n. 18, p. 2013-8, 2011.
- ALTINIER, G. et al. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 5, p. 1718-23, 2007.
- AMOR, S. et al. Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. **Immunology**, v. 142, n. 2, p. 151-66, 2014.
- ANTONIOLI, L. et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. **Curr Drug Targets**, v. 13, n. 6, p. 842-62, 2012.
- ANTONIOLI, L. et al. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? **Drug Discov Today**, v. 19, n. 8, p. 1051-68, 2014.
- ARRUDA-SILVA, F. et al. *Polygala molluginifolia* A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF-kappaB activation. **Int Immunopharmacol**, v. 19, n. 2, p. 334-41, 2014.
- ARTHUR, J. S.; LEY, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 9, p. 679-92, 2013.

ASHUTOSH, K. Nitric oxide and asthma: a review. **Curr Opin Pulm Med**, v. 6, n. 1, p. 21-5, 2000.

ASHWELL, J. D. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 7, p. 532-40, 2006.

BANSAL, Y.; SETHI, P.; BANSAL, G. Coumarin: a potential nucleus for anti-inflammatory molecules. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 7, p. 3049-3060, 2013.

BARNES, P. J. Nitric oxide and airway disease. **Ann Med**, v. 27, n. 3, p. 389-93, 1995.

_____. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. **Pharmacol Rev**, v. 56, n. 4, p. 515-48, 2004.

BARNES, P. J.; CHUNG, K. F.; PAGE, C. P. Inflammatory mediators of asthma: an update. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 4, p. 515-96, 1998.

BAZZONI, F. et al. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 9, p. 2360-8, 2010.

BHATTACHARYYA, S.; DUDEJA, P. K.; TOBACMAN, J. K. Carrageenan-induced NFkappaB activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 7-8, p. 973-82, 2008.

BLACKBURN, M. R. et al. Adenosine receptors and inflammation. **Handb Exp Pharmacol**, n. 193, p. 215-69, 2009.

BLUMENTHAL, R. **The Complete German Commission E monographs**. New York: The American Botanical Council, 2003.

BOLZANI, V. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S. **Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology**. Oxford, UK: Elsevier. 3: 95-133 p. 2010.

BORGES, F. R. et al. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid alpha-spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 144-50, 2014.

BOTTA, M. et al. Anti-inflammatory activity of a new class of nitric oxide synthase inhibitors that release nitric oxide. **ChemMedChem**, v. 3, n. 10, p. 1580-8, 2008.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 149-60, 2008.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131-4, 2005.

CALZADO, M. A.; BACHER, S.; SCHMITZ, M. L. NF-kappaB inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 3, p. 367-76, 2007.

CAPRA, J. C. et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. **Eur J Pharmacol**, v. 643, n. 2-3, p. 232-8, 2010.

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 75, n. 1, p. 50-83, 2011.

CHANG, H. T. et al. [Studies on xanthones from herbs of *Polygala telephioides*]. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 32, n. 21, p. 2259-61, 2007.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S3-23, 2010.

CHEONG, M. H. et al. Anti-inflammatory effects of *Polygala tenuifolia* root through inhibition of NF-kappaB activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1402-8, 2011.

CHO, N. et al. Chemical constituents of *Polygala tenuifolia* roots and their inhibitory activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglia. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 27, n. 1, p. 1-4, 2012.

CHURG, A. et al. Late intervention with a myeloperoxidase inhibitor stops progression of experimental chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 185, n. 1, p. 34-43, 2012.

COMMINS, S. P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S53-72, 2010.

COWBURN, A. S. et al. The survival effect of TNF-alpha in human neutrophils is mediated via NF-kappa B-dependent IL-8 release. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 6, p. 1733-43, 2004.

CRISTALLI, G. et al. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. **Med Res Rev**, v. 21, n. 2, p. 105-28, 2001.

CRONSTEIN, B. N. et al. Adenosine; a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils. **J Immunol**, v. 135, n. 2, p. 1366-71, 1985.

DALMARCO, E. M. et al. Modulatory effect of mycophenolate mofetil on carrageenan-induced inflammation in the mouse air pouch model. **Int Immunopharmacol**, v. 13, n. 4, p. 476-82, 2012.

DALMARCO, E. M.; FRODE, T. S. Methotrexate inhibits integrin adhesion molecules in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 777-784, 2007.

DAUBEUF, F.; FROSSARD, N. Eosinophils and the ovalbumin mouse model of asthma. **Methods Mol Biol**, v. 1178, p. 283-93, 2014.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **J Clin Biochem Nutr**, v. 48, n. 1, p. 8-19, 2011.

DIAMANT, G.; DIKSTEIN, R. Transcriptional control by NF-kappaB: elongation in focus. **Biochim Biophys Acta**, v. 1829, n. 9, p. 937-45, 2013.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **Eur J Immunol**, v. 37 Suppl 1, p. S34-45, 2007.

DONG, W. et al. The IRAK-1-BCL10-MALT1-TRAF6-TAK1 cascade mediates signaling to NF-kappaB from Toll-like receptor 4. **J Biol Chem**, v. 281, n. 36, p. 26029-40, 2006.

DOU, Y. et al. Scopoletin suppresses IL-6 production from fibroblast-like synoviocytes of adjuvant arthritis rats induced by IL-1beta stimulation. **Int Immunopharmacol**, v. 17, n. 4, p. 1037-43, 2013.

DUARTE, F. S. et al. Participation of dihydrostyryl-2-pyrone and styryl-2-pyrone in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 86, n. 1, p. 150-61, 2007.

DUARTE, F. S. et al. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 197, n. 3, p. 351-60, 2008.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **Eur J Pharmacol**, v. 569, n. 3, p. 228-36, 2007.

FISCHER, D. et al. A role for adenosine deaminase in human monocyte maturation. **J Clin Invest**, v. 58, n. 2, p. 399-407, 1976.

FOELL, D.; WITTKOWSKI, H.; ROTH, J. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 3, n. 7, p. 382-90, 2007.

FORBES, L. V. et al. Potent reversible inhibition of myeloperoxidase by aromatic hydroxamates. **J Biol Chem**, v. 288, n. 51, p. 36636-47, 2013.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. **Pharmacol Rev**, v. 63, n. 1, p. 1-34, 2011.

FRODE, 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, n. 4, p. 223-7, 2001.

FRODE, T. S.; SOUZA, G. E.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, v. 13, n. 3, p. 162-8, 2001.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-6, 2005.

FYLAKTAKIDOU, K. C. et al. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 30, p. 3813-33, 2004.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nat Rev Rheumatol**, v. 6, n. 4, p. 232-41, 2010.

GALLI, S. J.; BORREGAARD, N.; WYNN, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. **Nat Immunol**, v. 12, n. 11, p. 1035-44, 2011.

GAUTAM, R. et al. Anti-inflammatory, cyclooxygenase (COX)-2, COX-1 inhibitory, and free radical scavenging effects of *Rumex nepalensis*. **Planta Med**, v. 76, n. 14, p. 1564-9, 2010.

GHOSH, S.; ERZURUM, S. C. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. **Biochim Biophys Acta**, v. 1810, n. 11, p. 1008-16, 2011.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. **Adenosine deaminase: colorimetric method**. 3. Weinheim: Verlac Chemie, 1984.

GONZALEZ-GALLEGO, J.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; TUNON, M. J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. **Nutr Hosp**, v. 22, n. 3, p. 287-93, 2007.

GRAHAM, B. S. et al. Primary respiratory syncytial virus infection in mice. **J Med Virol**, v. 26, n. 2, p. 153-62, 1988.

GRANGER, D. N.; SENCHENKOVA, E. In: (Ed.). **Inflammation and the Microcirculation**. San Rafael (CA), 2010. (Integrated Systems Physiology—From Cell to Function).

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-8, 1982.

HANCOCK, R. E.; NIJNIK, A.; PHILPOTT, D. J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 243-54, 2012.

HANSBRO, P. M.; KAIKO, G. E.; FOSTER, P. S. Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma? **Br J Pharmacol**, v. 163, n. 1, p. 81-95, 2011.

HASKO, G. et al. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 9, p. 759-70, 2008.

HASKO, G. et al. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. **J Immunol**, v. 157, n. 10, p. 4634-40, 1996.

HAYASHI, T.; NAKAMURA, T.; TAKAOKA, A. [Pattern recognition receptors]. **Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi**, v. 34, n. 5, p. 329-45, 2011.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes Dev**, v. 26, n. 3, p. 203-34, 2012.

HIETBRINK, F. et al. Trauma: the role of the innate immune system. **World J Emerg Surg**, v. 1, p. 15, 2006.

HOULT, J. R.; PAYA, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **Gen Pharmacol**, v. 27, n. 4, p. 713-22, 1996.

IMPELLIZZERI, D. et al. Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation. **Biochem Pharmacol**, v. 81, n. 5, p. 636-48, 2011.

ITO, K. et al. Steroid-resistant neutrophilic inflammation in a mouse model of an acute exacerbation of asthma. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 39, n. 5, p. 543-50, 2008.

JACOBSON, K. A. Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. **Handb Exp Pharmacol**, n. 193, p. 1-24, 2009.

JANSSENS, S.; TSCHOPP, J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 5, p. 773-84, 2006.

JEON, Y. J. et al. Radicol suppresses expression of inducible nitric-oxide synthase by blocking p38 kinase and nuclear factor-kappaB/Rel in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 294, n. 2, p. 548-54, 2000.

KALVEGREN, H.; FRIDFELDT, J.; BENGTTSSON, T. The role of plasma adenosine deaminase in chemoattractant-stimulated oxygen radical production in neutrophils. **Eur J Cell Biol**, v. 89, n. 6, p. 462-7, 2010.

KHADEMI, M. et al. The effects of natalizumab on inflammatory mediators in multiple sclerosis: prospects for treatment-sensitive biomarkers. **Eur J Neurol**, v. 16, n. 4, p. 528-36, 2009.

KHAN, S. et al. Suppression of LPS-induced inflammatory and NF-kappaB responses by anomalin in RAW 264.7 macrophages. **J Cell Biochem**, v. 112, n. 8, p. 2179-88, 2011.

KILPATRICK, L. E. et al. Regulation of TNF mediated antiapoptotic signaling in human neutrophils: role of delta-PKC and ERK1/2. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 6, p. 1512-21, 2006.

KIM, H. J. et al. Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE(2) from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 261-266, 2004.

KIM, H. M. et al. Effect of Polygala tenuifolia root extract on the tumor necrosis factor-alpha secretion from mouse astrocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 3, p. 201-8, 1998.

KIM, K. S. et al. The inhibition of JNK MAPK and NF-kappaB signaling by tenuifoliside A isolated from Polygala tenuifolia in

lipopolysaccharide-induced macrophages is associated with its anti-inflammatory effect. **Eur J Pharmacol**, v. 721, n. 1-3, p. 267-76, 2013.

KIM, S. H. et al. Chemical constituents isolated from *Polygala japonica* leaves and their inhibitory effect on nitric oxide production in vitro. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 24, n. 1, p. 230-3, 2009.

KING, G. L. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. **J Periodontol**, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1527-34, 2008.

KINGHORN, A. D. et al. The Relevance of Higher Plants in Lead Compound Discovery Programs. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 6, p. 1539-1555, 2011.

KIPS, J. C. et al. Murine models of asthma. **Eur Respir J**, v. 22, n. 2, p. 374-82, 2003.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

KLEIN, L. C., JR. et al. Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Polygalaceae). **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 381, n. 2, p. 121-6, 2010.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 3, p. 206-20, 2005.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159-75, 2013.

KOU, J. et al. Antiinflammatory activity of *Polygala japonica* extract. **Fitoterapia**, v. 77, n. 6, p. 411-5, 2006.

KUMAR, S.; BOEHM, J.; LEE, J. C. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 9, p. 717-26, 2003.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. **Eur J Pharmacol**, v. 616, n. 1-3, p. 7-15, 2009.

KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. **Physiol Rev**, v. 92, n. 2, p. 689-737, 2012.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 6, p. a001651, 2009.

LECHNER, M.; LIRK, P.; RIEDER, J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. **Semin Cancer Biol**, v. 15, n. 4, p. 277-89, 2005.

LEE, M. R.; DOMINGUEZ, C. MAP kinase p38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with p38alpha protein. **Curr Med Chem**, v. 12, n. 25, p. 2979-94, 2005.

LIN, F. S. et al. Involvement of p42/p44 MAPK, JNK, and NF-kappaB in IL-1beta-induced ICAM-1 expression in human pulmonary epithelial cells. **J Cell Physiol**, v. 202, n. 2, p. 464-73, 2005.

LOKUTA, M. A.; HUTTENLOCHER, A. TNF-alpha promotes a stop signal that inhibits neutrophil polarization and migration via a p38 MAPK pathway. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 1, p. 210-9, 2005.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LUIKING, Y. C.; ENGELEN, M. P.; DEUTZ, N. E. Regulation of nitric oxide production in health and disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 13, n. 1, p. 97-104, 2010.

MACNEE, W. et al. Efficacy and safety of the oral p38 inhibitor PH-797804 in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised clinical trial. **Thorax**, v. 68, n. 8, p. 738-45, 2013.

MALLE, E. et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 6, p. 838-54, 2007.

MANDERSCHIED, P. A. et al. Bacterial clearance and cytokine profiles in a murine model of postsurgical nosocomial pneumonia. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, n. 4, p. 742-51, 2004.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 519-31, 2011.

MARQUES, M. *Securidaca L. (Polygalaceae) do Brasil*. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 34, n. 1, p. 7-44, 1996.

MARQUES, M. C. M.; PEIXOTO, A. L. Estudo taxonômico de *Polygala L.* subgênero *Ligustrina* (Chodat) Paiva (Polygalaceae). **Rodriguesia**, v. 58, n. 1, p. 95-146, 2007.

MENEGAZZI, M. et al. *Hypericum perforatum* attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 5, p. 740-53, 2006.

MEOTTI, F. C. et al. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. **J Pharm Pharmacol**, v. 58, n. 1, p. 107-12, 2006.

METZLER, K. D. et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. **Blood**, v. 117, n. 3, p. 953-9, 2011.

MILLAN, D. S. What is the potential for inhaled p38 inhibitors in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease? **Future Med Chem**, v. 3, n. 13, p. 1635-45, 2011.

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.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958-69, 2008.

NAGY, G. et al. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. **Immunol Lett**, v. 111, n. 1, p. 1-5, 2007.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 3, p. 173-82, 2006.

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, n. 3, p. 311-35, 2012.

OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. **Nat Immunol**, v. 12, n. 8, p. 695-708, 2011.

OGINO, K. et al. Meloxicam inhibits prostaglandin E(2) generation via cyclooxygenase 2 in the inflammatory site but not that via cyclooxygenase 1 in the stomach. **Pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 244-50, 2000.

OLZA, J. et al. Myeloperoxidase is an early biomarker of inflammation and cardiovascular risk in prepubertal obese children. **Diabetes Care**, v. 35, n. 11, p. 2373-6, 2012.

OMS. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. **Traditional and Complementary Medicines**, http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/, 2000. Disponível

em: < http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_EDM_TRM_2000.1.pdf >.

PACKARD, R. R.; LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. **Clin Chem**, v. 54, n. 1, p. 24-38, 2008.

PAIVA, J. A. R. **Polygalarum Africanarum et Madagascariensium prodmus atque gerontogaei generis Heterisamara Kuntze, a genere Polygala segregati et a nobis denuo recepti, synopsis monographica.** Madrid: 1998. 346

PARK, H. Y. et al. The relation of serum myeloperoxidase to disease progression and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61315, 2013.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777-89, 2001.

PAUL, S. et al. Anticancer Potentials of Root Extract of Polygala senega and Its PLGA Nanoparticles-Encapsulated Form. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, 2011.

PETRONILHO, S. et al. In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 1-12, 2012.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacogn Rev**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

PIZZOLATTI, M. G. et al. A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 6, p. 603-606, 2004.

PIZZOLATTI, M. G.; LUCIANO, C.; DELLE MONACHE, F. Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrones derivatives from *Polygala sabulosa*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 819-822, 2000.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* AW Bennett (Polygalaceae). **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 177-182, 2008.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 10, p. 803-15, 2007.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 4, p. 259-70, 2009.

RAO, T. S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723-41, 1993.

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

RIBAS, C. M. et al. Antinociceptive effect of the *Polygala sabulosa* hydroalcoholic extract in mice: evidence for the involvement of glutamatergic receptors and cytokine pathways. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 103, n. 1, p. 43-7, 2008.

RICCIARDOLO, F. L. et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiol Rev**, v. 84, n. 3, p. 731-65, 2004.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. **The world medicines situation 2011**. 3. Genova: World Health Organization, 2011.

SACCANI, S.; PANTANO, S.; NATOLI, G. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. **Nat Immunol**, v. 3, n. 1, p. 69-75, 2002.

SAKLATVALA, J. The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, n. 4, p. 372-7, 2004.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 3, p. 811-9, 1996.

SANJABI, S. et al. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 4, p. 447-53, 2009.

SCHIEVEN, G. L. The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. **Curr Top Med Chem**, v. 5, n. 10, p. 921-8, 2005.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 8, p. 93-131, 2006.

SOLOAGA, A. et al. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. **EMBO J**, v. 22, n. 11, p. 2788-97, 2003.

SOLT, L. A. et al. Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta. **J Biol Chem**, v. 282, n. 12, p. 8724-33, 2007.

SOUZA, M. F.; RAO, V. S.; SILVEIRA, E. R. Anti-anaphylactic and anti-inflammatory effects of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* Less. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 10, p. 1029-32, 1992.

SPEYER, C. L. et al. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. **Am J Pathol**, v. 165, n. 6, p. 2187-96, 2004.

STOYANOVA, II; GULUBOVA, M. V. Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. **Acta Histochem**, v. 104, n. 2, p. 185-92, 2002.

SUN, C. X. et al. A protective role for the A1 adenosine receptor in adenosine-dependent pulmonary injury. **J Clin Invest**, v. 115, n. 1, p. 35-43, 2005.

SUN, X. F.; ZHANG, H. NFKB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. **Histol Histopathol**, v. 22, n. 12, p. 1387-98, 2007.

SUSCHEK, C. V.; SCHNORR, O.; KOLB-BACHOFEN, V. The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all? **Curr Mol Med**, v. 4, n. 7, p. 763-75, 2004.

TIMONEN, J. M. et al. Synthesis and anti-inflammatory effects of a series of novel 7-hydroxycoumarin derivatives. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 9, p. 3845-50, 2011.

TOBIN, A. M.; KIRBY, B. TNF alpha inhibitors in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. **BioDrugs**, v. 19, n. 1, p. 47-57, 2005.

TOURDOT, S. et al. Respiratory syncytial virus infection provokes airway remodelling in allergen-exposed mice in absence of prior allergen sensitization. **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 6, p. 1016-24, 2008.

TOUSSIROT, E.; WENDLING, D. The use of TNF-alpha blocking agents in rheumatoid arthritis: an update. **Expert Opin Pharmacother**, v. 8, n. 13, p. 2089-107, 2007.

TRIANTAFILOU, K.; TRIANTAFILOU, M. Visualising PAMP-PRR interactions using nanoscale imaging. **Methods Mol Biol**, v. 799, p. 253-66, 2012.

TRIPATHI, P. et al. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 443-52, 2007.

TRITSCH, G. L.; NISWANDER, P. W. Adenosine deaminase activity and superoxide formation during phagocytosis and membrane

perturbation of macrophages. **Immunol Commun**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 1981.

UNO, S. et al. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, n. 3, p. 596-601, 2007.

VAN, Q. et al. Anti-inflammatory effect of *Inonotus obliquus*, *Polygala senega* L., and *Viburnum trilobum* in a cell screening assay. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, n. 3, p. 487-93, 2009.

VERMA, S. K. et al. Adenosine Deaminase (ADA) Level in Tubercular Pleural Effusion. **Lung India**, v. 25, n. 3, p. 109-10, 2008.

VIATOUR, P. et al. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. **Trends Biochem Sci**, v. 30, n. 1, p. 43-52, 2005.

VON BISMARCK, P. et al. Selective NF-kappaB inhibition, but not dexamethasone, decreases acute lung injury in a newborn piglet airway inflammation model. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 22, n. 4, p. 297-304, 2009.

WANG, H. et al. Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 5, p. 321-6, 2008.

WEBB, D. R. Animal models of human disease: inflammation. **Biochem Pharmacol**, v. 87, n. 1, p. 121-30, 2014.

WHITMARSH, A. J. A central role for p38 MAPK in the early transcriptional response to stress. **BMC Biol**, v. 8, p. 47, 2010.

WURDACK, J. J.; SMITH, L. B. Flora ilustrada catarinense: Polygalaceae. **Tipografia e Livraria Blumenauense S.A.**, p. 3-52, 1971.

YAO, X. et al. Inhibition of monosodium urate crystal-induced inflammation by scopoletin and underlying mechanisms. **Int Immunopharmacol**, v. 14, n. 4, p. 454-62, 2012.

YUHKI, K. et al. Prostaglandin receptors EP2, EP3, and IP mediate exudate formation in carrageenin-induced mouse pleurisy. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 311, n. 3, p. 1218-24, 2004.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell Res**, v. 15, n. 1, p. 11-8, 2005.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHANG, L. et al. Expression of tumor necrosis factor receptor-1 in arterial wall cells promotes atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 5, p. 1087-94, 2007.

ZHU, A. et al. Sputum myeloperoxidase in chronic obstructive pulmonary disease. **Eur J Med Res**, v. 19, p. 12, 2014.

APÊNDICE

Trabalhos desenvolvidos

Artigo submetido:

- *Polygala sabulosa* A.W. Bennett regulates the NF- κ B and p38 MAPK pathways to inhibit the inflammatory process induced by carrageenan in a mouse model of pleurisy, ao periódico *International Immunopharmacology*.

International Immunopharmacology

Submissions Being Processed for Author Eduardo Hongsilhoti Dalmarco, Ph.D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display: 10 results per page.

Actions	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status	Current Status
Action Links	INTHP-D-15-00027	<i>Polygala sabulosa</i> A.W. Bennett regulates the NF- κ B and p38 MAPK pathways to inhibit the inflammatory process induced by carrageenan in a mouse model of pleurisy	Jan 23, 2015	Under Review	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display: 10 results per page.

Resumos apresentados em anais de congressos:

- **NASCIMENTO, M. V. P. S.**; LUZ, A.B.G.; BARATTO, B.; DALMARCO, E.M.. 7-Prenyloxi-6-methoxycoumarin, the major compound of *Polygala sabulosa* A.W. Bennett, inhibit NF- κ B and p38 MAPK phosphorylation. In: I Simpósio do Programa de Pós-graduação em Farmácia UFSC, 2014, Florianópolis. I Simpósio do Programa de Pós-graduação em Farmácia UFSC, 2014.
- **NASCIMENTO, M. V. P. S.**; LUZ, A.B.G.; BARATTO, B.; DALMARCO, E.M.. *Polygala sabulosa* A.W. Bennett crude hydroalcoholic extract and acetonic fraction shows anti-inflammatory effects in the mouse model of pleurisy. In: I Simpósio do Programa de Pós-graduação em Farmácia UFSC, 2014, Florianópolis. I Simpósio do Programa de Pós-graduação em Farmácia UFSC, 2014.
- **NASCIMENTO, M. V. P. S.**; QUEIROZ, G.S.; SILVA, F.A.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; DALMARCO, E.M.. Anti-Inflammatory activities of *Bunchosia armeniaca*

(Cav.) DC. (Malpighiaceae). In: 11th World Congress on Inflammation and XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2013, Natal. Immuno Natal 2013 - Immunopharmacology, 2013.

ANEXO I

Protocolo de aprovação na comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFSC)
(PP00757)

PP00757

Título

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

Data de Entrada

24/04/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

01/06/2012

Considerações

Ofício nº 44/CEUA/PRPE/2011

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

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

Prezado(a) Professor(a),

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

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

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

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

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

Atenciosamente,

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

Data 05/09/2016

Data 05/06/2012

Parecer(es):



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

ANEXO II

Resumos em parceria apresentados em anais de congressos

- ARRUDA- SILVA, F.; NASCIMENTO, M. V. P. S.; LUZ, A. B. G.; VENZKE, D.; PIZZOLATTI, M. G.; DALMARCO, E. M.. Antiinflammatory effect of Rutin and Isoflavone (5,3,4-triidroxi-6,6-dimetilpirano[2,3:7,6] isoflavone) from *Polygala molluginifolia* A. St.-Hil. & Moq.. In: 11th World Congress on Inflammation and XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2013, Natal, RN. Immunopharmacology, 2013.

ANEXO III

Artigos em parceria

Artigo publicado

- SILVA, F.A.; **NASCIMENTO, M. V. P. S.**; LUZ, A.B.G.; VENZKE, D.; QUEIROZ, G.S.; FRODE, T. S.; PIZZOLATTI, M.G.; DALMARCO, E.M.. *Polygala molluginifolia* A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF- κ B activation. *International immunopharmacology (Print)*, v. 19, p. 334-341, 2014.

Artigo aceito

- QUEIROZ, G.S.; HELLER, M.; SILVA, F.A.; **NASCIMENTO, M. V. P. S.**; MICKE, G.A.; DALMARCO, E.M.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C.. Antibacterial and Anti-Inflammatory activities of *Bunchosia armeniaca* (Cav.) DC. (Malpighiaceae). *Records of Natural Products*, 2014.

Artigo submetido

- Anti-inflammatory effect of *Myrcia* species in the *in vivo* model of inflammation, ao periódico *International Journal of Green Pharmacy*.

SR	Article Title	Manuscript Id	Current Status	Remarks / file	Action
1	Anti-inflammatory effect of <i>Myrcia</i> species in the <i>in vivo</i> model of inflammation	IJGP_156_14	Editorial Review	-	Click here and write to the editor