

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA  
ANA BEATRIZ GOBBO LUZ

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E  
IMUNOMODULADOR DA *Ilex paraguariensis* A. St. Hil E  
SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS NO MODELO DA  
PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM  
CAMUNDONGOS**

Florianópolis

2016



**Ana Beatriz Gobbo Luz**

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E  
IMUNOMODULADOR DA *Ilex paraguariensis* A. St. Hil E  
SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS NO MODELO DA  
PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida 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  
2016

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

Gobbo Luz, Ana Beatriz  
ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E IMUNOMODULADOR DA  
ILEX PARAGUARIENSIS A. ST.HIL E SEUS COMPOSTOS  
MAJORITÁRIOS NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA  
CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS / Ana Beatriz Gobbo Luz ;  
orientador, Eduardo Monguilhott Dalmarco - Florianópolis,  
SC, 2016.  
112 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. inflamação. 3. pleurisia. 4. Ilex  
paraguariensis. I. Monguilhott Dalmarco, Eduardo . II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Farmácia. III. Título.

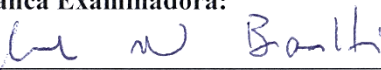
**“Estudo do efeito anti-inflamatório e imunomodulador da Ilex paraguariensis A. St. Hil e seus compostos majoritários no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos”**

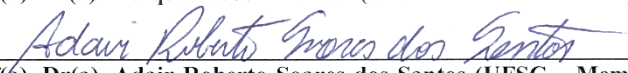
**POR**

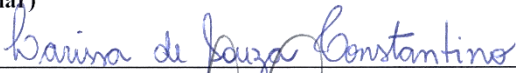
**Ana Beatriz Gobbo Luz**

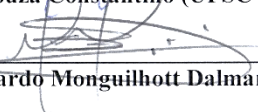
**Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:**


**Banca Examinadora:**

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

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Adair Roberto Soares dos Santos (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Dr(a). Larissa de Souza Constantino (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, 19 de fevereiro de 2016.



## AGRADECIMENTOS

Não poderia agradecer primeiramente se não a Deus, por estar sempre guiando meus passos diante das minhas escolhas de vida, além de colocar as pessoas essenciais para a minha evolução.

Agradeço à memória de minha avó, Maria de Lourdes Gobbo. Meu exemplo de mulher guerreira, espelho para toda a família. Te amo e sinto saudades.

Agradeço à melhor e mais incrível pessoa que hoje tenho em minha vida: minha mãe, Aparecida Gobbo. Minha maior incentivadora, amiga, exemplo. Sem o seu apoio, educação, carinho e amor nunca teria chegado onde cheguei. Te amo incondicionalmente.

A todos os meus familiares, que mesmo longe torcem infinitamente pelo meu sucesso e minha felicidade. Cada um de vocês - tios, tias, primos, primas - compõem o meu conceito de vida e e me mostram o verdadeiro significado da palavra família.

Ao meu namorado e também mestrando, Bruno Matheus, meu incentivo à carreira acadêmica, meu parceiro de discussões científicas e de horas à bancada. Meu momento de paz. Serei sempre grata pelo teu amor, tua compreensão, tua companhia e por teres me ensinado a pleurisia. Espero um dia retribuir tudo isso. Te amo.

Aos meus amigos e amigas por suportarem meus acessos de quase loucura e fazerem da situação uma oportunidade de extravasar. Em especial às minhas verdadeiras e fieis amigas que a tanto tempo conheço, que entenderam minha ausência em alguns momentos durante esses dois anos. Vamos aproveitar agora todo o tempo em que estive ausente!

Agradeço ao meu colega geminiano, Marcus Vinicius, por estar sempre disposto a ajudar, pensar e discutir, além de me proporcionar infinitas risadas em quase todos os momentos que estávamos no laboratório. Não menos importante, agradeço a todos os meus companheiros do Laboratório de Pesquisa em Imunologia, tanto os que já passaram quanto aos que ainda estão, pelos momentos (e que momentos!) que passamos juntos, pela troca de experiências e ideias.

Meu obrigada ao meu orientador, Prof. Eduardo Monguilhott Dalmarco, por estar sempre disposto a me auxiliar mesmo a milhares de quilômetros de distância e alguns fusos horários a mais. Obrigada por acreditar em mim e pela

oportunidade de me pós-graduar. Agradeço também à Prof. Tânia Fröde - professora responsável pelo laboratório - por todo o ensinamento, infraestrutura e por possibilitar a minha formação.

Agradeço ainda à CAPES, pelo apoio financeiro, e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia por todo o suporte dado durante meu mestrado.



## RESUMO

**Introdução:** O atual e crescente número de compostos derivados de plantas nos mais variados estágios de desenvolvimento, principalmente em estudos clínicos, indica que a investigação científica de produtos naturais é uma fonte viável na pesquisa de novos candidatos a fármacos. Neste contexto, a *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, é a principal representante do gênero *Ilex* e uma espécie nativa da América do Sul, distribuída nas regiões subtropicais e temperadas da Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil. É amplamente usada na medicina popular para tratar artrite, obesidade, fadiga e acometimentos hepáticos e intestinais. Por este motivo, acreditamos que o seu estudo farmacológico merece destaque.

**Objetivos:** Avaliar o efeito anti-inflamatório e imunomodulador do extrato bruto padronizado, frações e compostos majoritários da *I. paraguariensis*, administrados por via oral, no modelo de pleurisia induzida pela carragenina (Cg) em camundongos.

**Método:** Folhas secas e trituradas de *I. paraguariensis* foram submetidas à turbulização com etanol 20° GL para obtenção do extrato bruto (EB) liofilizado. As frações butanólica (BuOH) e residual aquosa (RAq) foram obtidas por partição com *n*-butanol. O perfil químico do extrato bruto foi determinado por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) e espectrometria de massas (EM). No modelo da pleurisia, foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas, 1 mês, 18-25g (PP00965/CEUA/2015). A pleurisia foi induzida de acordo com a metodologia descrita por Saleh e colaboradores (1996). Após 4 horas de pleurisia, o lavado pleural obtido dos animais pré-tratados com EB, BuOH, RAq, cafeína (Caf), rutina (Rut) ou ácido clorogênico (AcCl) foi utilizado para avaliar a migração de leucócitos totais, neutrófilos e quantificação da concentração de exsudato. Em seguida, procedeu-se a avaliação das atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO), adenosina desaminase (ADA), quantificação da concentração dos metabólitos do óxido nítrico (NOx), concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 e IL-10). O tecido pulmonar também foi coletado e utilizado para avaliação histológica e para avaliar a ação dos compostos majoritários sobre a fosforilação da

subunidade p65 do NF- $\kappa$ B (p-p65 NF- $\kappa$ B). Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA complementada por Newman-Keuls onde  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

**Resultados:** Nas doses estudadas, EB, BuOH, RAq, Caf, Rut e AcCl inibiram de maneira significativa a migração de leucócitos, às custas de neutrófilos, bem como a exsudação ( $P < 0,05$ ). As doses selecionadas de EB, frações e compostos majoritários apresentaram efeito inibitório significativo sobre MPO, ADA e NO $_x$ , além de, inibir as principais citocinas pró inflamatórias relacionadas a polarização do sistema imune para a resposta Th1/Th17 ( $P < 0,05$ ). EB, RAq e AcCl demonstraram causar aumento significativo sobre a concentração de IL-10 ( $P < 0,05$ ). A lesão pulmonar causada pela Cg foi atenuada pelo pré-tratamento dos animais em todos os grupos estudados ( $P < 0,05$ ). Finalmente, os compostos majoritários Caf, Rut e AcCl inibiram significativamente a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B quando comparados ao grupo Cg ( $P < 0,01$ ).

**Conclusão:** Os resultados do presente estudo demonstraram que a atividade anti-inflamatória da *I. paraguariensis* no modelo da pleurisia induzida pela carragenina é decorrente, dentre outros fatores, da sua capacidade imunomoduladora sobre o microambiente inflamatório sendo esse efeito, em parte, consequência da ação de seus compostos majoritários sobre via de sinalização do NF- $\kappa$ B.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis*. Inflamação. Pleurisia.

## ABSTRACT

### **Study of anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil and its major compounds in the model of pleurisy induced by carrageenan in mice.**

**Introduction:** The current and growing number of plant-derived compounds in various stages of development, particularly in clinical trials, indicates that scientific research of natural products is a viable source in the search for new drug candidates. In this context, *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae), popularly known as yerba mate, is a representative of the *Ilex* genus and a native species of South America, distributed in subtropical and temperate regions of Argentina, Paraguay, Uruguay and Brazil. It is widely used in folk medicine to treat arthritis, obesity, fatigue and liver and intestinal affections. For this reason, we believe that its pharmacological study must be highlighted.

**Objectives:** Evaluate the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *I. paraguariensis* standardized crude extract, fractions and major compounds, orally administered, in the carrageenan (Cg)-induced murine model of pleurisy.

**Methodology:** Dried and crushed leaves were subjected to turbolization process with 20° GL ethanol to obtain freeze-dried crude extract (EB). The butanolic fraction (BuOH) and aqueous residual fraction (RAq) were obtained by partitioning with *n*-butanol. The chemical profile of extract was determined by ultra performance liquid chromatography (UPLC) and mass spectrometry (MS). The pleurisy model employed female Swiss mice with 1 month, weighing 18-21g (this project was approved by the Ethics Committee on Animal Use of UFSC - PP00965 / CEUA / 2015). Pleurisy was induced according to the method described by Saleh and coworkers (1996). Four hours after pleurisy, pleural fluids leakage obtained from pretreated animals with EB, BuOH, RAq, caffeine (Caf), rutin (Rut) or chlorogenic acid (AcCl) were used to evaluate the inflammatory parameters: total leukocytes and neutrophils migration, and quantification of exudate concentration. Then, proceeded to the evaluation of myeloperoxidase (MPO) and adenosine deaminase (ADA) activities, measurement of nitric oxide metabolites (NOx) concentration, quantification of pro- and anti-inflammatory

cytokines (IL-6, IL-17A IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 and IL-10). The lung tissues of all groups were collected and used for histologic evaluation of leukocyte infiltration and edema, and lung tissues obtained from groups treated only with major compounds were used to evaluate the p65 NF- $\kappa$ B phosphorylation (p-p65 NF- $\kappa$ B). Statistical differences were determined by ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test.  $P < 0.05$  values were considered significant.

**Results:** BE, BuOH, RAq, Caf, Rut and AcCl significantly reduced the leukocyte content, due to inhibition of neutrophil migration, as well as exudation ( $P < 0.05$ ). The selected doses of EB fractions and major compounds showed significant effect upon MPO, ADA and NO $_x$ , and, in general, inhibited the release of pro-inflammatory cytokines related to Th1/Th17 polarization ( $P < 0.05$ ). EB, RAq and AcCl showed a significant increase of IL-10 concentration ( $P < 0.05$ ). The lung injury caused by Cg was attenuated by animals pretreatment in all groups ( $P < 0.05$ ). Finally, the major compounds Caf, Rut and AcCl significantly inhibited p65 NF- $\kappa$ B phosphorylation when compared to the Cg group ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** The results of this study showed that anti-inflammatory activity of *I. paraguariensis* in the carrageenan-induced pleurisy model is due, among other factors, to its immunomodulatory capacity at inflammatory microenvironment and this effect is partly result of the action of its major compounds on signaling pathway of NF- $\kappa$ B.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*. Inflammation. Pleurisy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hilare.....	26
Figura 2 - Atividade da MPO na formação de agentes oxidantes .. .....	32
Figura 3 - Vias de formação e ação da adenosina.....	34
Figura 4 - Liberação e efeitos do NO no processo inflamatório.	36
Figura 5 - Via canônica de ativação do NF- $\kappa$ B.....	41
Figura 6 - Perfil temporal do modelo da pleurisia induzida por carragenina em camundongos. ....	44
Figura 7 - Esquema da curva dose-resposta utilizando modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	53
Figura 8 - Cromatograma do extrato bruto das folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> por CLUE/DAD com detecção em 280 nm.....	61
Figura 9 - Sobreposição de cromatogramas do extrato bruto e frações de <i>Ilex paraguariensis</i> obtidos por CLUE/DAD em 280 nm.....	62
Figura 10 - Efeito do extrato bruto (EB) da <i>Ilex paraguariensis</i> sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (A) e exsudação (B). ....	65
Figura 11 - Efeito da fração butanólica (BuOH) da <i>Ilex paraguariensis</i> sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (A) e exsudação (B). ....	66
Figura 12 - Efeito da fração residual aquosa (RAq) da <i>Ilex paraguariensis</i> sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (A) e exsudação (B). ....	67

Figura 13 - Efeito do composto majoritário cafeína (Caf) sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (A) e exsudação (B).....	68
Figura 14 - Efeito do composto majoritário rutina (Rut) sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (A) e exsudação (B).....	69
Figura 15 - Efeito do composto majoritário ácido clorogênico (AcCl) sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (A) e exsudação (B).....	70
Figura 16 - Curva tempo-resposta do extrato bruto (EB 25 mg/kg) de <i>Ilex paraguariensis</i> no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos.....	71
Figura 17 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos majoritários da <i>Ilex paraguariensis</i> sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO).....	73
Figura 18 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos majoritários da <i>Ilex paraguariensis</i> sobre a atividade da adenosina deaminase (ADA).....	74
Figura 19 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos majoritários da <i>Ilex paraguariensis</i> sobre as concentrações dos metabólitos do óxido nítrico (NOx).....	75
Figura 20 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos majoritários da <i>Ilex paraguariensis</i> sobre os níveis das principais citocinas pró-inflamatórias.....	77
Figura 21 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos majoritários da <i>Ilex paraguariensis</i> sobre os níveis de interleucina 10 (IL-10).....	79
Figura 22 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos majoritários da <i>Ilex paraguariensis</i> sobre a lesão pulmonar.....	80

Figura 23 - Efeito dos compostos majoritários da *Ilex paraguariensis* sobre a fosforilação da subunidade p65 NF- $\kappa$ B (p-p65 NF- $\kappa$ B)..... 82

Figura 24 - Resumo gráfico do efeito anti-inflamatório e imunomodulador da *I. paraguariensis*.....91





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AcCl: ácido clorogênico
- ADA: adenosina desaminase
- ADP: adenosina difosfato
- AMP: adenosina monofosfato
- AMPC: adenosina monofosfato cíclico
- ANOVA: análise de variância
- AP-1: proteína ativadora 1
- APCs: células apresentadoras de antígenos
- ATP: adenosina trifosfato
- BAFFR: receptor ativador para fator nuclear *kappa* B
- BuOH: fração butanólica
- Caf: cafeína
- CBA: *Cytometric Bead Array*
- CCL2: ligante 2 de CC quimiocina
- Cg: carragenina
- CLUE: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
- COX-2: ciclooxigenase 2
- CTLA4: antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
- CXCL8: ligante 8 de CXC quimiocina
- DAMPs: padrões moleculares associados a dano
- Dex: dexametasona
- DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica
- e.p.m.: erro padrão da média
- EB: extrato bruto hidroalcoólico
- ELISA: ensaio imunoenzimático

EM: espectrometria de massas

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

ERK: proteína cinase regulada por sinal extracelular

ERN: espécies reativas de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio

Hsp27: proteína de choque térmico 27

HTAB: brometo de hexadeciltrimetilamonio

*I. paraguariensis*: *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

i.p.: via intraperitoneal

i.pl.: via intrapleural

i.v.: via intravenosa

IFN- $\gamma$ : interferon *gamma*

IgE: imunoglobulina E

I $\kappa$ B $\alpha$ : subunidade inibitória do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B

IKK: proteína inibitória *kappa* B cinase

IL-10: interleucina 10

IL-13: interleucina 13

IL-17A: interleucina 17A

IL-1 $\beta$ : interleucina 1 *beta*

IL-2: interleucina 2

IL-21: interleucina 21

IL-22: interleucina 22

IL-23: interleucina 23

IL-4: interleucina 4

IL-5: interleucina 5

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8  
iNOS: óxido nítrico sintase induzida  
IRF3: fator regulador de interferon  
JNK: cinase c-Jun N-terminal  
LBA: lavado broncoalveolar  
LPS: lipopolissacarídeo  
LT $\beta$ R: receptor *beta* de linfotóxina  
MAPK: proteínas cinases ativadas por mitógenos  
MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1  
MHC: complexo principal de histocompatibilidade  
MMP: metaloproteinases  
MPO: mieloperoxidase  
MPV: matéria prima vegetal  
NADPH: adenina dinucleotídeo fosfato  
NETs: *neutrophil extracellular traps*  
NF- $\kappa$ B: fator de transcrição nuclear *kappa* B  
NK: *natural killer*  
NLR: receptores tipo NOD  
nNOS: óxido nítrico sintase neuronal  
NOS: óxido nítrico sintase  
NOx: metabólitos do óxido nítrico  
OVA: ovalbumina  
p50: subunidade (p50) do fator nuclear NF- $\kappa$ B  
p65: subunidade (p65) do fator nuclear NF- $\kappa$ B  
PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos  
DAD: detector de arranjo de diodos  
PDE: fosfodiesterase

PRRs: receptores de reconhecimento de padrões

RAq: fração residual aquosa

RAW 264.7: Linhagem celular murina

RelA: subunidade (RelA) do fator nuclear NF- $\kappa$ B

RelB: subunidade (RelB) do fator nuclear NF- $\kappa$ B

RLR: receptores tipo RIG-I

Rut: rutina

Sal: salina

SCID: imunodeficiência combinada grave

SIA: septos interalveolares

SOD: superóxido dismutase

TACE: enzima conversora de TNF- $\alpha$

Tcit: células T citotóxicas

TCR: receptor de célula T

TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformante *beta*

Th0: linfócitos T *naive*

Th1: linfócitos T *helper 1*

Th17: linfócitos T *helper 17*

Th2: linfócitos T *helper 2*

TLR: receptores tipo Toll

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral *alfa*

TNFR1: receptor 1 de TNF- $\alpha$

TNFR2: receptor 2 de TNF- $\alpha$

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

TR: tempo de retenção

Treg: linfócito T regulatório

v.o.: via oral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1. Plantas Medicinais e Produtos Naturais.....	23
1.2. Gênero <i>Ilex</i> .....	25
1.2.1. <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hilaire.....	25
1.3. Processo Inflamatório.....	27
1.3.2. Imunidade inata.....	28
1.3.2.1. Neutrófilos.....	29
1.3.2.2. Mediadores inflamatórios.....	30
1.3.2.2.1. Mieloperoxidase (MPO).....	30
1.3.2.2.2. Adenosina desaminase (ADA).....	31
1.3.2.2.3. Óxido Nítrico (NO).....	34
1.3.3. Imunidade Adaptativa.....	36
1.3.3.1. Th1/Th2/Th17.....	37
1.3.3.2. Citocinas.....	37
1.3.3.3. Fator de transcrição nuclear <i>kappa</i> B (NF- $\kappa$ B).....	40
1.4. Imunomodulação.....	42
1.5. Modelos de inflamação das vias aéreas.....	43
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
2.1. Objetivo Geral.....	47
2.2. Objetivos Específicos.....	47
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
3.1. Material Vegetal.....	49
3.1.1. Preparação e caracterização dos extratos de <i>I.</i> <i>paraguariensis</i> :.....	49
3.1.2. Material vegetal.....	49
3.1.3. Preparo e fracionamento do extrato bruto.....	49
3.1.4. Caracterização química dos extratos e frações.....	50
3.2. Experimentação <i>in vivo</i> .....	50
3.2.1. Animais.....	50
3.2.2. Modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongo.....	51
3.2.3. Procedimento anestésico e eutanásia dos animais.....	53
3.2.4. Quantificação de leucócitos totais e diferencial celular.....	54
3.2.5. Coloração dos esfregaços celulares.....	54
3.2.6. Quantificação da concentração de exsudato.....	54
3.2.7. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	55

3.2.8. Determinação da atividade de adenosina desaminase (ADA).....	55
3.2.9. Quantificação dos produtos do óxido nítrico (NOx).....	56
3.2.10. Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ ).....	57
3.2.11. Análise histológica.....	58
3.2.12. Avaliação da subunidade p65 fosforilada (p-p65 NF- $\kappa$ B).....	58
3.2.13. Fármacos e Reagentes.....	59
3.2.14. Análise estatística.....	59
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
4.1. Caracterização química dos extratos e frações.....	61
4.2. Efeitos da <i>I. paraguariensis</i> sobre o influxo de leucócitos e exsudação.....	63
4.3. Efeitos da <i>I. paraguariensis</i> sobre MPO e ADA.....	72
4.4. Efeito da <i>I. paraguariensis</i> sobre NOx.....	72
4.5. Efeitos da <i>I. paraguariensis</i> sobre as concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	75
4.6. Efeitos da erva-mate sobre os aspectos histológicos pulmonares.....	80
4.7. Efeito dos compostos majoritários da <i>I. paraguariensis</i> sobre a fosforilação de p65 NF- $\kappa$ B.....	81
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICE A – TRABALHOS DESENVOLVIDOS.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO A– TRABALHOS EM PARCERIA .....</b>	<b>111</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. PLANTAS MEDICINAIS E PRODUTOS NATURAIS

Por definição da Organização Mundial da Saúde (OMS), a medicina tradicional nada mais é do que o conhecimento, a habilidade e as práticas baseadas em teorias, crenças e experiências de diferentes culturas, sendo essas explicáveis ou não, utilizadas na manutenção da saúde bem como na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças físicas e mentais. Para tanto, faz-se o uso dos produtos da medicina tradicional, que incluem ervas, materiais vegetais e preparações que contenham partes de plantas, outros materiais vegetais ou combinações como ingredientes ativos (WHO, 2013). Muitas vezes, a utilização de plantas medicinais no manejo das patologias da população deve-se, além do fator cultural, ao seu baixo custo e a também à facilidade de acesso (FERREIRA et al., 2014). Diante disso, a pesquisa fitoquímica baseada na etnofarmacologia é considerada uma abordagem efetiva no descobrimento de novas entidades químicas (KASHANI et al., 2012).

Os compostos farmacologicamente ativos encontrados em produtos naturais existem como resultado da evolução e adaptação de organismos terrestres e marinhos frente à diversas situações de estresse (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2014). Além disso, tais compostos são uma excelente fonte para descoberta de potenciais fármacos uma vez que podem ser utilizados diretamente no tratamento de doenças ou servir como ponto de partida para a síntese de novas moléculas (BAUER; BRÖNSTRUP, 2014).

Na década de 1980, ponto alto na descoberta e desenvolvimento de novas moléculas, as novas técnicas químicas, como a química combinatória, eram favorecidas pelas indústrias farmacêuticas. O interesse na “redescoberta de produtos naturais” veio logo após esse período, levando em consideração o valor de desenvolvimento de fármacos derivados de produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Estudo realizado por Fabricant e Farnsworth (2001) revelou que, na época, 122 compostos puros estavam sendo utilizados como fármacos, em sua maioria com a mesma finalidade a qual eram empregadas na medicina tradicional, e que esses eram provenientes de apenas 94 espécies de plantas. Levando-se em

consideração apenas a flora mundial, que conta com aproximadas 298 mil espécies de plantas, é evidente a abundância de potenciais compostos que possam se tornar promissores no tratamento das mais variadas doenças (MORA et al., 2011). Estima-se que da totalidade de plantas existentes em todo o mundo apenas 6% foram investigadas farmacologicamente e 15% fitoquimicamente (CRAGG; NEWMAN, 2013). Com base nisso, é notável uma tendência positiva no que diz respeito ao estudo de produtos naturais. Por exemplo, entre os anos de 2008 e 2013, um total de 25 produtos naturais ou derivados de produtos naturais foram aprovados para uso pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014).

O crescente número de compostos derivados de plantas em vários estágios de estudos clínicos indica que a investigação científica dos produtos naturais é uma fonte viável de novos candidatos a fármacos (MISHRA; TIWARI, 2011; RISHTON, 2008; SCHMIDT et al., 2008). Dentre esses, investigados com as mais variadas funções biológicas, há certo interesse nos atuantes em doenças imunológicas e inflamatórias, por exemplo. O composto WBI-1001, conhecido como benvitimod e desenvolvido pela Stiefel Laboratories, foi isolado inicialmente das bactérias *Xenorhabdus* sp. e *Photorhabdus luminescens* e até 2012 encontrava-se em ensaio clínico de fase 2 para o tratamento de psoríase com redução de citocinas pró-inflamatórias e da migração de células T. Outro composto derivado de produtos naturais nesse cenário é o KRP-203, investigado em estudo clínico de fase 2 pela Kyorin Pharmaceutical para transplantes, doenças autoimunes e doenças inflamatórias intestinais (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014).

Dessa maneira, o estudo farmacológico de plantas tem sido alvo de muitos pesquisadores, dentre eles os brasileiros. Um dos principais motivos desse interesse em nosso país deve-se ao fato do Brasil possuir flora bastante diversificada e grande parte da população utilizar plantas na busca do alívio da dor, da inflamação e na tentativa de cura de várias doenças.



## 1.2. GÊNERO *ILEX*

O único gênero representante da família Aquifoliaceae é o *Ilex* que data de cerca de 90 milhões de anos onde evidências apontam para sua existência na região da Austrália. Esse gênero é representado por arbustos e árvores com importância econômica e plantas ornamentais (CUÉNOUD, 2000; GOTTLIEB; GIBERTI; POGGIO, 2005) cuja distribuição é comum no leste e sudeste da Ásia e também nas Américas do Norte e do Sul (CUÉNOUD, 2000).

São relatadas aproximadamente 600 espécies para o gênero *Ilex*, sendo que 12 dessas são encontradas no sul da América do Sul, onde a espécie *I. paraguariensis* é a mais relevante do ponto de vista social e econômico (GOTTLIEB; GIBERTI; POGGIO, 2005; MANEN et al., 2010).

Algumas atividades biológicas já são relatadas para o gênero *Ilex*. São exemplos: atividade antioxidante (BRAVO et al., 2014), emagrecedora (ARÇARI et al., 2009; GAMBERO; RIBEIRO, 2015), hipoglicemiante (KANG et al., 2012b), neuroprotetora (SANTOS et al., 2015), antimicrobiana (PRADO MARTIN et al., 2013), ansiolítica (SANTOS et al., 2015), analgésica (LIM et al., 2015) e anti-inflamatória (ARÇARI et al., 2011; LANZETTI et al., 2008).

### 1.2.1. *Ilex paraguariensis* A. St. Hilaire

Conhecida popularmente como erva-mate, é a principal representante do gênero *Ilex*. Espécie nativa da América do Sul, está distribuída em regiões subtropicais e temperadas de países como Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil (HECK; DE MEJIA, 2007). Nesse último, é encontrada mais especificamente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia e também no Distrito Federal (GROPPO, 2015).

Trata-se de uma árvore que pode atingir até 18 metros de altura, perene, dióica e produtora de flores e frutos, com floração entre outubro e novembro e produção de frutos nos meses de março a junho (BASTOS et al., 2007; HECK; DE MEJIA, 2007) (**Figura 1**).

Seu uso tradicional teve início com indígenas guaranis que utilizavam tal planta para a preparação de bebidas estimulantes ou ainda por suas propriedades medicinais (BRACESCO et al., 2011). O consumo ocorre principalmente através de bebidas conhecidas como mate, erva-mate, chimarrão ou tereré. Há muito tempo vem sendo utilizada na medicina popular onde é recomendada para o tratamento de artrite, constipação, reumatismo, hemorroidas, obesidade, fadiga, retenção de líquidos, hipertensão e acometimentos hepáticos e intestinais (BASTOS et al., 2007).

É comprovado que a *I. paraguariensis* possui em sua constituição fitoquímica compostos das classes das metilxantinas, flavonoides, saponinas triterpênicas, taninos, as vitaminas A, B, C e E, e, em maior quantidade, ácido clorogênico (BASTOS et al., 2007; BRACESCO et al., 2011; REGINATTO et al., 1999)

O crescente número de patentes sobre produtos derivados da erva-mate indica o interesse nas atividades biológicas e poder econômico dessa planta. Desde 1963 até meados de 2007, estavam patenteados 29 produtos derivados da *I. paraguariensis* com diversas indicações (BASTOS et al., 2007). Nos últimos 15 anos, a quantidade de estudos sobre a erva-mate aumentou indicando propriedades antioxidantes, vasodilatadoras e redutora de lipídios, anti-glicação, na redução de peso, entre outras (BRACESCO et al., 2011).

**Figura 1 - *Ilex paraguariensis* A. St. Hilare**



Fonte: Tropicos.org, Missouri Botanical Garden. 12 Nov 2015  
<http://www.tropicos.org/Image/45902>

### 1.3. PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação ocorre em resposta a um agente lesivo no intuito de remover tal estímulo danoso ao tecido. O termo inflamação, proveniente do latim *inflammare*, foi primeiramente utilizado por Celsus há cerca de 2000 anos, cujo o qual documentou os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, edema, calor e dor. No século 19, Virchow caracterizou o quinto sinal cardinal: perda de função (TEDGUI, 2011).

O processo inflamatório compreende uma série de eventos celulares e vasculares que incluem, por exemplo, recrutamento de células, liberação de mediadores químicos e enzimas, angiogênese, liberação de fatores de crescimento, produção de citocinas e quimiocinas, apoptose celular, entre outros (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

A função primária do processo inflamatório é a rápida destruição ou isolamento do agente perturbador, remoção do dano tecidual e a restauração da homeostase (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012). O término da resposta inflamatória e a transição para um estado de homeostase é um processo ativo e altamente regulado, conhecido por resolução da inflamação. Consiste basicamente na alteração do perfil pró-inflamatório (prostaglandinas) para uma resolução induzida por lipoxinas, o que medeia a transição de neutrófilos para o recrutamento de monócitos com a subsequente depuração de células apoptóticas e debris e o início do reparo tecidual (MEDZHITOV, 2010).

Tendo isso em vista, é fundamental que todo o processo seja finamente regulado, uma vez que alterações e defeitos funcionais em algum ponto da resposta inflamatória podem culminar em inflamação excessiva e conseqüentemente no desenvolvimento de patologias (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012).

Os mecanismos pelos quais o organismo provê a defesa necessária podem ser divididos didaticamente em imunidade inata, que medeia a proteção inicial, e ainda imunidade adaptativa, que caracteriza uma resposta mais especializada e efetiva contra o agente lesivo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014).

### 1.3.2. IMUNIDADE INATA

O sistema imune inato, também conhecido como natural, é o principal responsável pela resposta aguda causada por infecção ou dano tecidual. É constituído de barreiras epiteliais, fagócitos, células dentríticas, *natural killers* (NK), e também pelo sistema complemento, importantes para posterior ativação do sistema imune adaptativo (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Seu padrão de resposta pode se dar de duas maneiras distintas. A fagocitose de um agente lesivo extracelular por células apresentadoras de antígenos (APCs) é seguida do processamento do mesmo e geração de peptídeos que são expostos via complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II (enquanto agentes lesivos intracelulares são apresentados via MHC I), estando então aptos a serem reconhecidos por linfócitos via receptor de célula T (TCR). De maneira simultânea, há o reconhecimento de estruturas comuns às várias classes de microrganismos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ou ainda dos padrões moleculares associados a dano (DAMPs), pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (DE NARDO, 2015; WALSH; MILLS, 2013).

São exemplos de PRRs existentes os receptores tipo RIG-I (RLR), receptores tipo NOD (NLR) e ainda os receptores do tipo Toll (TLR). Esses últimos são os principais, e mais amplamente estudados, PRR encontrados em células. Atualmente, são conhecidos 10 diferentes tipos de TLR em humanos e 12 em camundongos, entretanto, todos consistem em proteínas transmembrana capazes de reconhecer PAMPs no ambiente extracelular ou em endolisossomos (DE NARDO, 2015). Uma vez ativados, com exceção do TLR3, todos os TLR acoplam o adaptador MyD88 e, em combinação com outros adaptadores, desencadeiam cascatas intracelulares que levam a ativação de importantes fatores de transcrição pró-inflamatórios (DE NARDO, 2015; NEWTON; DIXIT, 2012).

Por serem ponto chave da imunidade inata e estarem envolvidos na sucessão de eventos pró-inflamatórios, os PRRs, mais especificamente os TLRs, vêm sendo amplamente estudados como potenciais alvos de modulação da resposta inflamatória. Como exemplo, o TLR4, ativado classicamente por lipopolissacarídeo (LPS) mas também por outros agentes

flogísticos - como a carragenina (BHATTACHARYYA et al., 2008) -, é fundamental para a ativação de importantes fatores de transcrição, como o fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), fator regulador de interferon (IRF3) e ainda diferentes proteínas cinases ativadas por mitógenos (p38, ERK e JNK) envolvidas na inflamação (DE NARDO, 2015).

### 1.3.2.1. NEUTRÓFILOS

Dentre as células da imunidade inata, os neutrófilos - leucócitos mais abundantes na circulação - fazem parte da primeira linha de defesa em uma resposta inflamatória aguda.

Estima-se que  $5 \times 10^{10}$  a  $10 \times 10^{10}$  novos neutrófilos são formados na medula óssea a cada dia (SADIK; KIM; LUSTER, 2011). De maneira distinta ao que acontece em humanos, os neutrófilos de camundongos correspondem apenas de 10% a 25% dos leucócitos circulantes. Entretanto, em ambos, esses têm por função a destruição ou a neutralização do agente causador da inflamação através de diversos mecanismos (JAILLON et al., 2013), e são classicamente caracterizados pela sua capacidade fagocítica, liberação de enzimas líticas de seus grânulos e produção de espécies reativas com potencial antimicrobiano (MANTOVANNI et al., 2011).

Diferentemente de outros tipos leucocitários, os neutrófilos sofrem completa maturação antes de alcançarem a circulação sanguínea. Apresentam curto tempo de meia vida (aproximadamente 6-8 horas em humanos e 11 horas em roedores) e, na ausência de inflamação, sofrem apoptose espontânea (SADIK; KIM; LUSTER, 2011; WANG; ARASE, 2014).

Durante seu processo de maturação, estruturas de armazenamento e secreção, ou grânulos, são formadas e armazenam algumas proteínas características. Os grânulos primários (ou azurófilos) estocam mieloperoxidase (MPO), elastase, defensinas, lisozima, entre outras moléculas. Já os grânulos secundários (ou específicos) contém diversos compostos antimicrobianos, incluindo a lactoferrina. Os grânulos terciários (ou de gelatinase) possuem poucas substâncias antimicrobianas, todavia estocam diferentes metaloproteinases (MMP), como a gelatinase e leucolisina. Por fim, existem ainda as vesículas secretoras que são formadas por endocitose durante o processo

final de maturação do neutrófilo e, por isso, sua principal molécula estocada são proteínas derivadas do plasma, tais como a albumina (AMULIC et al., 2012).

De uma maneira geral, diante de estímulos inflamatórios o recrutamento de neutrófilos compreende as fases de: a) marginação, propiciada pela redução do fluxo sanguíneo decorrente da vasodilatação dependente de mediadores pró-inflamatórios; b) rolamento, via expressão de moléculas de adesão (selectinas); c) adesão, mediada pela expressão de integrinas; d) rastejamento entre as células endoteliais; e por fim, e) a transmigração para o tecido acometido (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

O incessante estudo sobre esse tipo celular trouxe evidências de sua participação não só na imunidade inata propriamente dita. Estudos recentes demonstram que os neutrófilos expressam e produzem uma gama de citocinas e quimiocinas, tanto de maneira constitutiva ou decorrente de sua ativação por estímulos do microambiente, e que isso está envolvido não somente em processos fisiológicos mas também patológicos norteados por esse tipo celular (TECCHIO; MICHELETTI; CASSATELLA, 2014).

### **1.3.2.2. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS**

#### **1.3.2.2.1. MIELOPEROXIDASE (MPO)**

Um importante marcador inflamatório a ser destacado é a enzima MPO. Descrita primeiramente como “verdoperoxidase” por Agner em 1941 em um estudo de empiema tuberculoso, essa enzima tem sido detectada em uma variedade de doenças inflamatórias (TOBLER; KOEFFLER, 1991). A MPO, uma heme peroxidase, encontra-se armazenada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e em menor proporção em monócitos, e participa dos processos neutrofílicos de fagocitose, degranulação e também na formação de NETs (*neutrophil extracellular traps*) (PROKOPOWICZ et al., 2012). Em seres humanos, representa cerca de 7% do equivalente à massa total de um neutrófilo e essa relação é três vezes menor no que diz respeito aos monócitos. Diferenças são observadas entre espécies animais onde, por exemplo, a quantidade de MPO contida em neutrófilos roedores

representa aproximadamente 15% do conteúdo de neutrófilos humanos (NUSSBAUM et al., 2013).

Uma vez fagocitado o microorganismo, o fagossoma formado auxilia na ativação da MPO. O primeiro sistema acionado durante a fagocitose é o da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxigenase (NADPH oxigenase) que, a partir do oxigênio ( $O_2$ ), forma o ânion superóxido ( $\bullet O_2^-$ ). Esse serve de substrato para a enzima superóxido dismutase (SOD) gerar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). De maneira simultânea, a MPO é liberada e utiliza o  $H_2O_2$  e íons cloreto presentes no fagossoma para formar o ácido hipocloroso (HOCl) e cloraminas (WINTERBOURN; KETTLE, 2013) (**Figura 2**).

A MPO é a única peroxidase humana capaz de halogenar substratos, principalmente a partir de íons cloretos, em pH fisiológico. Logo, a presença desses substratos modificados é tida como a "impressão digital" da presença de MPO ativa no tecido (KLEBANOFF et al., 2013).

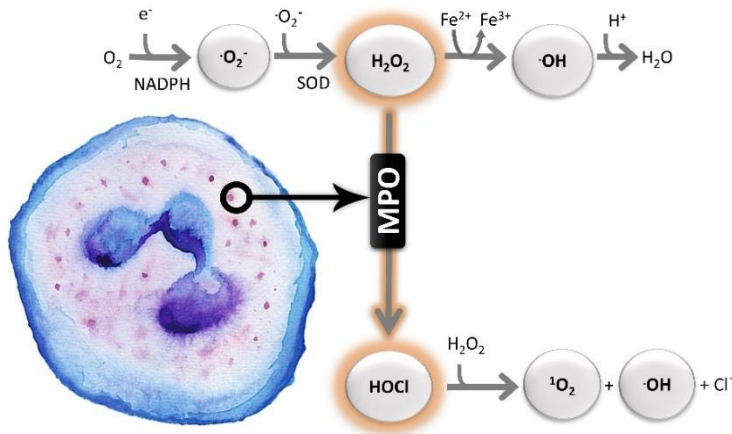
Embora os oxidantes produzidos - como o HOCl - possuam papel fundamental na eliminação de patógenos, quando em excesso estão associados ao dano tecidual e a progressão de múltiplas doenças, tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, renais, artrite reumatoide e doenças pulmonares, como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (DAVIES et al., 2008; IWAMOTO et al., 2014).

#### **1.3.2.2.2. ADENOSINA DESAMINASE (ADA)**

Outra enzima envolvida na resposta inflamatória é a adenosina desaminase (ADA). Sua função é converter de maneira irreversível a adenosina em inosina e, dentre outras enzimas, como a 5'-nucleotidase e adenosina cinase, é intitulada como a principal responsável na regulação dos níveis de adenosina (KHODADADI, 2014).

Em humanos, são conhecidas 3 isoformas de ADA: ADA-1, ADA-2 e ADA-3. As duas primeiras apresentam alta similaridade em relação ao mecanismo enzimático, entretanto, diferem quanto sua localização, sendo a ADA-1 localizada no espaço intracelular e ADA-2 localizada extracelularmente (ANTONIOLI et al., 2012). Ambas as isoformas promovem sinalização co-estimulatória na sinapse imune, resultando no

**Figura 2 - Atividade da MPO na formação de agentes oxidantes**



Durante a ativação do neutrófilo no processo de fagocitose, as enzimas responsáveis pela geração de  $H_2O_2$  são a NADPH oxidase e a SOD. Esse produto gerado é substrato para a MPO que tem como ação converter  $H_2O_2$  em  $HOCl$ , substância com importante atividade microbicida.  $Cl^-$ : cloreto;  $e^-$ : elétron;  $H^+$ : hídrion;  $H_2O$ : água;  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio;  $HOCl$ : ácido hipocloroso; MPO: mieloperoxidase; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase;  $\cdot O_2^-$ : ânion superóxido;  $O_2$ : oxigênio molecular;  $\cdot OH$ : radical hidroxila SOD: superóxido dismutase. Fonte: Elaborada pela autora, adaptado de Winterbourn e Kettle (2013).

aumento da produção de citocinas do tipo T *helper* 1 (Th1) e também no aumento da proliferação de células T (JUNGER, 2011).

Diversas linhas de evidências têm demonstrado o interessante papel dessa enzima como alvo do manejo terapêutico de diferentes desordens patológicas, como inflamação, isquemia e até mesmo alguns tipos de cânceres (ANTONIOLI et al., 2012). A importância da ADA é ainda destacada pelo fato de que uma desordem genética que resulta em deficiência dessa enzima provoca imunodeficiência combinada grave (SCID), doença caracterizada pelo desenvolvimento prejudicado de células T e células B com risco aumentado de infecções, devido à excessiva ativação de receptores de adenosina (JUNGER, 2011). Além disso, vale ressaltar que a ADA vem sendo utilizada como marcador diagnóstico de tuberculose (SHADIA, 2015) e sua atividade



encontra-se diminuída em pacientes com DPOC e também fibrose pulmonar idiopática (ZHOU et al., 2010).

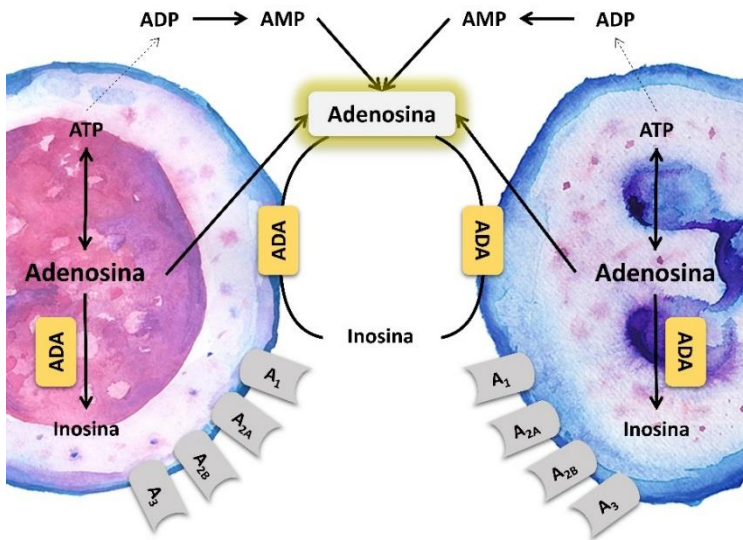
A adenosina pode desempenhar efeitos pró- ou anti-inflamatório dependentes da concentração de adenosina existente no local, do tipo específico de receptor a qual se liga e também da expressão tecidual dos mesmos. Os 4 receptores transmembrana de adenosina que medeiam seus efeitos biológicos são todos acoplados à proteína G e denominados de A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (ANTONIOLI et al., 2014). A atividade anti-inflamatória da adenosina é mediada principalmente pela ativação dos receptores A<sub>2A</sub>, como pode ser observado também em modelo de inflamação aguda (HASKÓ et al., 2008; ROCHA LAPA et al., 2012) (**Figura 3**).

Durante a inflamação, a adenosina pode ser liberada por diferentes células e regular a função delas ou de outras. Por exemplo, neutrófilos ativados liberam adenosina que auxilia na modulação de suas atividades fagocíticas, oxidantes e microbicidas (BARLETTA; LEY; MEHRAD, 2012) além de, via receptores A<sub>2A</sub>, inibir a expressão de moléculas de adesão, o que por consequência propicia um efeito anti-inflamatório (YAGO et al., 2015). Além disso, a adenosina é essencial na modulação da resposta de linfócitos uma vez que, via receptores A<sub>2A</sub>, há inibição da secreção de interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4) e interferon *gama* (IFN- $\gamma$ ) por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (ANTONIOLI et al., 2014).

Estudos recentes apontam que a inosina - produto de degradação da adenosina - também é capaz de interagir com os receptores de adenosina e proporcionar menor recrutamento de leucócitos e liberação de citocinas pró-inflamatórias (ROCHA LAPA et al., 2012, 2013).

É evidente que a via de sinalização da adenosina assume distintos efeitos de acordo com o estadiamento da condição patológica e também do tecido envolvido. Em estados patológicos agudos, a adenosina contribui amplamente para respostas protetoras, enquanto que em estados crônicos a sinalização de adenosina pode promover processos celulares, tais como fibrose, que contribuem para a progressão da doença (KARMOUTY-QUINTANA; XIA; BLACKBURN, 2013).

**Figura 3 - Vias de formação e ação da adenosina**



Diferentes tipos celulares estão envolvidos na síntese de adenosina. Ela pode ser produzida intracelularmente e exportada para o espaço extracelular através de transportadores de nucleosídeos, ou ainda pode ser resultado da degradação extracelular de nucleotídeos de adenina liberados (ATP e/ou ADP). Uma vez liberada vai agir em diferentes receptores ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ). A enzima ADA exerce sua função de gerar inosina a partir de adenosina tanto a nível extracelular quanto intracelular. ADA: adenosina desaminase; ADP: adenosina difosfato; AMP: adenosina monofosfato; ATP: adenosina trifosfato. Fonte: Elaborada pela autora, adaptado de Antonioli et al. (2014).

### 1.3.2.2.3. ÓXIDO NÍTRICO (NO)

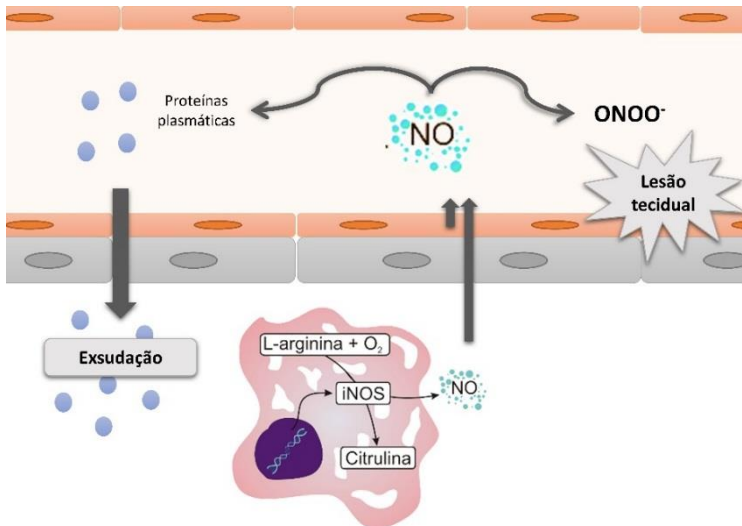
Outro mediador participante do processo inflamatório e que deve ser citado é o óxido nítrico (NO), gás solúvel liberado principalmente por células endoteliais e macrófagos. Ele está envolvido em diversos processos biológicos como a regulação do tônus vascular, inflamação, neurotransmissão e apoptose. Além disso, é um importante vasodilatador que participa da resposta imune inata e/ou adaptativa (BOGDAN, 2015; TOUSOULIS et al., 2012).

O NO é liberado a partir da reação de conversão da L-arginina em L-citrulina, catalisada pela família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS). São conhecidas ao menos três isoformas desta enzima, que diferem quanto a estrutura e função: duas são constitutivas – neuronal (nNOS, NOS1) e endotelial (eNOS, NOS3) – ativadas principalmente por mecanismos  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentes e presentes em condições fisiológicas, enquanto a terceira isoforma é conhecida como NOS induzida (iNOS, NOS2) e liberada frente a um estímulo imunológico, como a liberação de mediadores endógenos (citocinas e quemocinas) ou fatores exógenos (toxinas bacterianas, alérgenos, poluentes) (BOGDAN, 2015).

A concentração de NO em condições fisiológicas é da ordem de  $\eta\text{M}$ , onde essas baixas concentrações favorecem os efeitos benéficos desse mediador. Entretanto, durante a inflamação, a iNOS libera grandes quantidades de NO (na ordem de  $\mu\text{M}$ ) que são sustentadas durante horas após a exposição ao agente desencadeante (KOLIOS; VALATAS; WARD, 2004; RICCIARDOLO et al., 2004). Logo, a função do NO depende da sua concentração e associação com outras moléculas e proteínas. O NO pode reagir com o  $\text{O}_2$  ou  $\bullet\text{O}_2^-$  e formar nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), o que acaba por ser altamente danoso para o tecido (GHOSH; ERZURUM, 2011) (**Figura 4**).

O papel da iNOS, do NO e suas associações às diferentes moléculas, é de suma importância na patogênese da asma. É observado em pacientes asmáticos, quando comparados a indivíduos normais, uma maior expressão e atividade da iNOS, maiores níveis de NO,  $\text{NO}_3^-$  e nitrotirosina nas vias aéreas (GHOSH; ERZURUM, 2011).

**Figura 4 - Liberação e efeitos do NO no processo inflamatório**



Em condições inflamatórias, o aminoácido L-arginina, através da ação da iNOS, é oxidado à L-citrulina. Esse processo libera um gás solúvel, o NO, que está implicado na maior permeabilidade vascular, formação de edema e produção de ERNs. ERNs: espécies reativas de nitrogênio; iNOS: óxido nítrico sintase induzida; NO: óxido nítrico; ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito. Fonte: Elaborada pela autora, adaptado de Ghosh e Erzurum, (2011).

### 1.3.3. IMUNIDADE ADAPTATIVA

Quando um antígeno é capaz de transpor a barreira inata da resposta imune, representada por barreiras físicas, químicas e pelo processo inflamatório agudo, segue-se a apresentação de tal agente aos linfócitos T *helper* (Th) via APCs. Assim, estes linfócitos proliferam formando populações efetoras que governam as respostas específicas, seja através da produção de citocinas por células Th CD4<sup>+</sup>, da atividade citotóxica de células T CD8<sup>+</sup> (Tcit), ou ainda através da produção de anticorpos por plasmócitos que se diferenciam a partir de células B (WALSH; MILLS, 2013) (WALSH 2013).

### 1.3.3.1. Th1/Th2/Th17

A polarização para os diferentes tipos de células Th depende do microambiente a qual elas se encontram, principalmente das citocinas que nelas atuam. As células T *náive* (Th0), quando estimuladas por interleucina 12 (IL-12), diferenciam-se em Th1 produtoras principalmente de IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral *alfa* (TNF- $\alpha$ ). Essa subpopulação está envolvida no processo inflamatório, na resposta à patógenos intracelulares e também em reações de hipersensibilidade (RAPHAEL et al., 2014).

Por outro lado, caso a estimulação seja por IL-4, há polarização para resposta do tipo Th2 cujas principais citocinas secretadas são IL-4, interleucina 5 (IL-5) e interleucina 13 (IL-13), direcionadas de forma clássica às infecções por helmintos e processos alérgicos (RAPHAEL et al., 2014).

Com o descobrimento de outras subpopulações de células Th sabe-se que para a diferenciação de Th0 em Th17 é necessária a presença de citocinas como interleucina 6 (IL-6), interleucina 23 (IL-23) e fator de crescimento transformante *beta* (TGF- $\beta$ ). Linfócitos diferenciados e produtores de interleucina 17 (IL-17), interleucina 21 (IL-21) e interleucina 22 (IL-22) são primordiais na inflamação e na autoimunidade, estando envolvidos na patogênese da asma neutrofílica ou severa (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015; MANIATI; SOPER; HAGEMANN, 2010).

Contraopondo as células T efetoras, tem-se uma diferente população: as T regulatórias (Treg). Essas células desempenham função supressora sobre as outras uma vez que produzem citocinas como interleucina 10 (IL-10) e TGF- $\beta$  (NOACK; MIOSSEC, 2014).

### 1.3.3.2. CITOCINAS

Citocinas é um nome genérico dado às pequenas proteínas liberadas por variadas células e que propiciam a interação e comunicação entre elas. Dependendo de sua função e do tipo celular que as secretam, podem ser classificadas em linfocinas, monocinas, quimiocinas e interleucinas. Uma vez secretadas podem agir de maneira autócrina, parácrina e ainda endócrina (DINARELLO, 2007).

Diversas células liberam citocinas que, por sua vez, medeiam os mais variados processos biológicos, incluindo o processo inflamatório. Nele, agem como importantes mediadores auxiliando na manutenção da homeostasia e determinando o tipo de resposta imune, sendo consideradas fundamentais imunomoduladoras (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

A IL-2 é uma citocina pleiotrópica secretada por células Th0 após a apresentação de antígenos. Rege o crescimento e diferenciação de linfócitos T em Th1, Th2, Treg, mas não Th17, dependendo do microambiente formado após a apresentação de antígenos (LIAO; LIN; LEONARD, 2011). Além disso, é uma citocina com papel crítico na resposta do tipo Th2 visto que prepara células T para essa polarização e mantém a expressão de genes em células comprometidas com a diferenciação para esse fenótipo (LIAO et al., 2008).

Representante da resposta do tipo Th1, o IFN- $\gamma$  é sintetizado, além dessas células, por linfócitos Tcit e células NK. Suas funções biológicas incluem o aumento das funções fagocíticas por mononucleares, citotóxicas de células NK, estimulação da adesão de neutrófilos ao endotélio e inibição da replicação viral e de outros patógenos intracelulares (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória expressa principalmente por mononucleares ativadas, mas também por células como neutrófilos, linfócitos Th1, células NK, mastócitos e células endoteliais (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). É uma proteína ligada à membrana que necessita da clivagem por uma metaloproteinase - a enzima conversora de TNF- $\alpha$  (TACE) - para tornar-se solúvel e exercer suas funções biológicas, que incluem: efeitos citotóxicos em células tumorais, indução de moléculas de adesão que favorecem a migração leucocitária ao sítio inflamatório, atuação sobre a função de neutrófilos mediando processos como adesão, quimiotaxia, degranulação e *burst* respiratório, entre outras (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). O TNF- $\alpha$  exerce seus efeitos através da ligação a dois receptores distintos - TNFR1 e TNFR2 - que vão culminar na ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e proteína ativadora-1 (AP-1) (SEDGER; MCDERMOTT, 2014). A participação do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento de diversas patologias e condições é bem relatada, como nos casos de: câncer, seps,

artrite reumatoide, diabetes e doença inflamatória intestinal (SABIO; DAVIS, 2014).

Outra citocina fundamental durante o processo inflamatório é a IL-6. Liberada por células da imunidade inata, principalmente monócitos/macrófagos, após o reconhecimento de PAMPs e DAMPs possui amplas e redundantes funções. Atua na diferenciação dos linfócitos T onde é crucial, juntamente com o TGF- $\beta$ , para o desenvolvimento de células Th17 (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). Sua ação sobre os neutrófilos compreende a facilitação da transmigração dessas células para o tecido lesado através da indução de moléculas de adesão e produção de quimiocinas por diferentes tipos celulares (MIHARA et al., 2012). Reconhecida não somente como um marcador pró-inflamatório, está envolvida na patogênese de doenças como artrite reumatoide (CALABRESE; ROSE-JOHN, 2014), asma (RINCON; IRVIN, 2012), entre outras.

A IL-17, ou interleucina 17A (IL-17A), foi a primeira citocina descrita de uma família que hoje compreende seis membros (IL-17A a IL-17F) e desde então é a mais investigada devido sua forte participação em processos inflamatórios, distúrbios metabólicos, câncer e autoimunidade (GU; WU; LI, 2013). As fontes dessa citocina incluem principalmente os linfócitos Th17, mas também linfócitos T $\gamma\delta$ , macrófagos, neutrófilos, células NK, entre outras (ISAILOVIC et al., 2015). As vias de sinalização as quais a IL-17 é capaz de ativar incluem a via do NF- $\kappa$ B e vias de proteínas cinases como ERK, JNK e p38 MAPK. Sua participação em doenças como artrite reumatoide, asma e doença de Crohn está associada à migração de fagócitos por consequência de sua ação sobre o epitélio, favorecendo a liberação de quimiocinas atraentes de neutrófilos e macrófagos, como por exemplo CXCL8 (ou IL-8) e CCL2 (ou MCP-1) (SHABGAH; FATTAHI; SHAHNEH, 2014). A presença de altos níveis de IL-17 no lavado broncoalveolar (LBA), escarro e biopsia pulmonar de pacientes asmáticos possui correlação positiva com a severidade da doença e está associada à não responsividade desses pacientes ao uso de glicocorticoides (CHESNÉ et al., 2014).

A IL-4 é a principal citocina determinante para a polarização de resposta imune do tipo Th2. As principais células produtoras de IL-4 são linfócitos (Th0 e Th2), basófilos, eosinófilos e mastócitos. Sua função é regular a proliferação celular, a apoptose e a expressão de genes em células como

linfócitos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais mediando a resposta imune contra parasitas e a produção de anticorpos IgE (LUZINA et al., 2012).

A principal citocina imunoregulatória que apresenta significativa atividade anti-inflamatória é a IL-10. Classicamente uma citocina de resposta Th2, é também secretada por outras células - como os linfócitos Treg – e possui potente capacidade inibitória sobre a produção das principais citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ), bem como sobre a expressão de MHC II em APCs. Além dos linfócitos T, é secretada também por células como monócitos/macrófagos, células dendríticas, NK e linfócitos B (MANNINO et al., 2015; NOACK; MIOSSEC, 2014).

### 1.3.3.3. FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR *kappa* B (NF- $\kappa$ B)

O NF- $\kappa$ B está envolvido na resposta celular a diversos estímulos, controlando a expressão de mais de 400 genes envolvidos nas mais diversas funções, como a de imunoreceptores, quemocinas, citocinas, moléculas de adesão celular, proliferação, transformação, apoptose, angiogênese, estresse oxidativo, invasão e metástase (BATRA; BALAMAYOORAN; SAHOO, 2011). O aumento da ativação de NF- $\kappa$ B está implicado na patogênese de diversas doenças, como artrite reumatoide, aterosclerose, câncer e doenças pulmonares (ALVIRA, 2014).

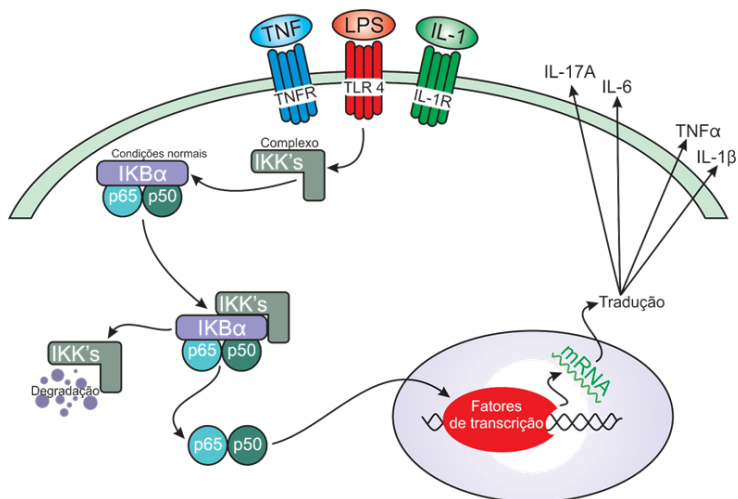
Cinco diferentes proteínas pertencentes à família do NF- $\kappa$ B foram identificadas em mamíferos: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50 e seu precursor p105) e NF- $\kappa$ B2 (p52 e seu precursor p100). Tais proteínas se apresentam na forma de hetero ou homodímeros, sendo o heterodímero p65/p50 o mais abundante na grande maioria das células (HOESEL; SCHMID, 2013). São conhecidas três vias de ativação desse fator de transcrição: via canônica, via não-canônica e via atípica. A primeira corresponde a ativação do heterodímero p50/RelA e ocorre através da ligação de LPS, TNF- $\alpha$  ou interleucina 1 (IL-1) a seus receptores, TLR, TNFR e IL-1R, respectivamente (**Figura 5**). A segunda necessita da ativação de outros, como o receptor do fator de ativação de célula B (BAFFR), CD40, receptor ativador para fator nuclear *kappa* B (RANK) ou ainda do receptor  $\beta$  de linfotóxina (LT $\beta$ R),



para que haja a participação de outro heterodímero, o p52/RelB. Por fim, a via atípica é ativada por estresse genotóxico (HOESEL; SCHMID, 2013).

Uma vez associado à subunidade inibitória do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ), o NF- $\kappa$ B mantém-se inativo no citoplasma, pois a interação NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ Bs mascara o sinal de localização nuclear (HOESEL; SCHMID, 2013). Está bem demonstrado que, principalmente, a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e sua consequente translocação do citoplasma para o núcleo, promove a transcrição gênica de diversas enzimas inflamatórias, citocinas, entre outros mediadores (BATRA; BALAMAYOORAN; SAHOO, 2011). Desta forma, agentes que tenham a capacidade de inibir a ativação deste fator de transcrição têm se tornado alvos promissores como agentes anti-inflamatórios. Neste sentido, compostos que demonstrem importante efeito anti-inflamatório e que, ao mesmo tempo, inibam a ativação do NF- $\kappa$ B são moléculas promissoras no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças de caráter inflamatório.

**Figura 5 - Via canônica de ativação do NF- $\kappa$ B.**



A via canônica, ou via clássica, de ativação do NF- $\kappa$ B é desencadeada através da ativação de receptores como TNFR, TLR ou IL-1R. O complexo I $\kappa$ B $\alpha$ /p65/p50, que em condições normais encontra-se inativo no citoplasma, é fosforilado por um complexo de cinases (IKK). Tal fato leva à degradação da I $\kappa$ B $\alpha$  com consequente livre translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo onde é responsável pela transcrição de genes pró-

inflamatórios. IKK: proteína inibitória kappa B cinase; I $\kappa$ B $\alpha$ : subunidade inibitória do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B; IL-1 $\beta$ : interleucina 1 $\beta$ ; IL-1R: receptor de interleucina 1; LPS: lipopolissacarídeo; TLR4: receptor do tipo Toll 4; TNF- $\alpha$ : fator necrose tumoral *alfa*; TNFR: receptor de fator necrose tumoral. Fonte: (SILVA, 2014)

#### 1.4. IMUNOMODULAÇÃO

O desequilíbrio entre os diferentes subtipos de linfócitos T por muitas vezes está na base causadora de muitas doenças, principalmente as de cunho inflamatório crônico, como a artrite reumatoide (LINA et al., 2011), lúpus eritematoso sistêmico (DOLFF et al., 2011), psoríase (QUAGLINO et al., 2011) e asma alérgica (SHI et al., 2011). Nesse contexto, abordagens terapêuticas que impactem na modulação imune entre essas subpopulações vêm ganhando espaço e importância de estudo.

O conceito de imunomodulação abrange seu sentido mais amplo, compreendendo intervenções que modifiquem a resposta imune com intenção terapêutica. Pode ser destinada a aumentar a resposta imune ou diminuí-la caso seja nociva. No primeiro caso, uma resposta imune mais ativa é desejável em dois tipos de situações: quando a resposta é patologicamente diminuída ou quando a resposta imune "normal" é insuficiente para controlar uma condição patológica específica. Isso ocorre em exemplos como as imunodeficiências, infecções e câncer. Já quando existem casos de alergias ou doenças autoimunes, o segundo caso se faz necessário (GEA-BANACLOCHE, 2006).

Por exemplo, em relação à asma alérgica cujo padrão clássico é a resposta do tipo Th2, a imunoterapia pode ocorrer através da modulação das respostas de células T ao alérgeno, quer seja através de um desvio imune para uma resposta Th1, seja através da indução de uma resposta "Th2 modificada" ou resposta de células Treg com elevada secreção de IL-10 (KAY, 2003).

A classificação dos atuais agentes imunomoduladores leva em consideração a fase da resposta imunológica ao qual atuam. Podem agir na apresentação de antígenos, como anti-CTLA4, ativação de células T, como no caso da ciclosporina A e do Tacrolimus, e ainda na proliferação dessas células, tendo como exemplo o metotrexato. Outros agentes ainda incluem os corticoides e anticorpos anti-TNF, como etanercept e infliximab (GEA-BANACLOCHE, 2006).

## 1.5. MODELOS DE INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS

O uso de animais na pesquisa clínica é muito questionado atualmente. Entretanto, a implementação de procedimentos corretos com animais condizentes às limitações de cada modelo agrega valor e é de extrema importância no que diz respeito ao entendimento da patogênese de diversas doenças humanas, bem como no desenvolvimento de novas terapias. Guardadas as devidas proporções, evidências recentes demonstram que a correlação entre a utilização de modelos animais e as doenças humanas se faz necessária e justificável uma vez que existe alta homologia entre os genes de camundongos e humanos envolvidos em diferentes condições (TAKAO; MIYAKAWA, 2015).

Doenças como artrite reumatoide, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal e asma possuem modelos animais amplamente difundidos e aplicados (WEBB, 2014). Em relação a asma, apenas humanos, gatos e cavalos podem desenvolver de maneira espontânea essa doença. Diante das complexidades que norteiam tal patologia, como os múltiplos gatilhos, heterogeneidade celular e fatores genéticos, a criação de um modelo animal que abranja uma maior proporção de fatores, seja robusto e assim mimetize a situação asmática humana é um grande desafio (MULLANE; WILLIAMS, 2014).

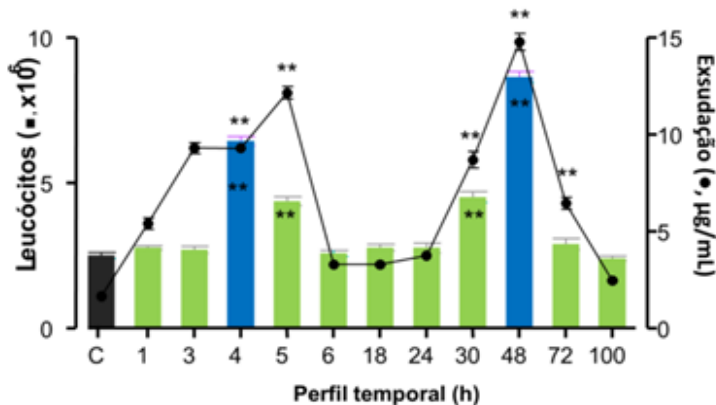
Diferentes animais e modelos para estudar uma condição mimetizadora da asma humana são empregados em laboratório. O modelo mais adotado é o que utiliza camundongos da linhagem BALB/c sensibilizados com ovalbumina (OVA). Esse é um modelo experimental de asma eosinofílica, ou asma alérgica, que possibilita avaliar parâmetros inflamatórios como migração eosinofílica, hiperresponsividade das vias aéreas e ainda o remodelamento tecidual (MULLANE; WILLIAMS, 2014).

Considerando as diferenças fenotípicas da doença, para retratar uma condição de asma neutrofílica emprega-se a pleurisia induzida por agentes flogísticos como o LPS ou a carragenina (Cg). A indução utilizando Cg, polissacarídeo aniônico natural extraído de algas vermelhas da família Rhodophyceae, apresenta um perfil de resposta do tipo bifásico, semelhante ao que ocorre na asma humana. A primeira fase (4h) é marcada por infiltração de leucócitos na cavidade pleural, principalmente do tipo neutrófilos,

e formação de exsudato, enquanto na segunda (48h), há a inversão do perfil leucocitário, com o predomínio de mononucleares, sendo observada também exsudação, porém de forma mais intensa (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996) (**Figura 6**). Além disso, diferentemente do que acontece em modelo de camundongos sensibilizados com OVA, a pleurisia induzida por Cg é um modelo caracterizado pela polarização de resposta do tipo Th1/Th17, com envolvimento de suas respectivas citocinas (DA ROSA et al., 2013; FRÓDE; SOUZA; CALIXTO, 2001).

A Cg participa da ativação da imunidade inata pois apresenta a capacidade de desencadear respostas intracelulares envolvendo diversos adaptadores e proteínas cinases que culminam na ativação de NF- $\kappa$ B (BHATTACHARYYA et al., 2008). Além disso, esse agente flogístico pode ainda induzir o processo inflamatório através da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), visto seu efeito deletério sobre os níveis da proteína de choque térmico 27 (Hsp27), o que acarreta na ativação de cinases relacionadas as vias de ativação de NF- $\kappa$ B e das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (BHATTACHARYYA; DUDEJA; TOBACMAN, 2008).

**Figura 6 - Perfil temporal do modelo da pleurisia induzida por carragenina em camundongos.**



O perfil do modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos é do tipo bifásico. Sua primeira fase (4 h) é representada por uma resposta aguda marcada pela migração massiva de polimorfonucleares para a cavidade pleural, além da formação de exsudato. Já sua segunda fase (48 h) há uma inversão do perfil leucocitário, com predomínio nessa fase

de mononucleares, presença de exsudação e é observado o início do remodelamento tecidual. Fonte: Adaptado de (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito imunomodulador como possível mecanismo anti-inflamatório do extrato bruto padronizado, frações e compostos majoritários da *I. paraguariensis* A. St.-Hil., no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito do extrato bruto padronizado, suas frações e compostos majoritários sobre a migração de leucócitos e exsudação no lavado da cavidade pleural;
2. Avaliar o efeito do extrato bruto padronizado, suas frações e compostos majoritários sobre as atividades da mieloperoxidase (MPO), adenosina-desaminase (ADA), e sobre as concentrações de metabólitos do óxido nítrico (NOx) no lavado da cavidade pleural;
3. Avaliar o efeito do extrato bruto padronizado, suas frações e compostos majoritários sobre as concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias no lavado pleural: interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-17A (IL-17A), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ );
4. Avaliar o efeito do extrato bruto padronizado, suas frações e compostos majoritários sobre os parâmetros histológicos: infiltração celular e alteração da arquitetura pulmonar.
5. Avaliar o efeito, no tecido pulmonar, dos compostos majoritários sobre a fosforilação da subunidade p65 (RelA) do fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B).





### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIAL VEGETAL**

##### **3.1.1. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE *I. PARAGUARIENSIS*:**

As amostras utilizadas nos ensaios farmacológicos da presente dissertação foram fornecidas pelo doutorando Carlos Henrique Blum da Silva do Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PPGFar/UFSC), sob orientação do Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto.

Os dados referentes ao desenvolvimento e validação das metodologias analíticas foram executados em parceria como o aluno de Doutorado em Farmácia (Carlos Henrique Blum da Silva) e fazem parte de sua tese de doutorado. Dessa forma, somente serão apresentados nesta dissertação, os resultados dos compostos identificados nos extratos/frações por CLUE/DAD e CLUE/EM, bem como os resultados dos teores dos compostos quantificados, enquanto os parâmetros analíticos e de validação da metodologia farão parte da referida tese.

##### **3.1.2. MATERIAL VEGETAL**

Folhas de *I. paraguariensis* foram coletadas no município de Erechim, Rio Grande do Sul. A identificação botânica foi realizada pela Professora Branca Maria Aimi Severo e material testemunho está depositado no Herbário da Universidade de Passo Fundo (RSPF 11074).

As folhas foram congeladas, liofilizadas, moídas em moinho de facas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da preparação do extrato.

##### **3.1.3. PREPARO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO**

A matéria prima vegetal (MPV) foi extraída por turbulização utilizando como líquido extrator (LE) etanol 20° GL. Após a filtração, o etanol foi eliminado sob pressão reduzida e posteriormente dividido em duas partes. Uma parte foi congelada e submetida à liofilização para secagem completa, originando o

extrato bruto (EB). A outra parte foi particionada com *n*-butanol, originando as frações butanólica (BuOH) e residual aquosa (RAq).

### 3.1.4. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

O perfil químico dos extratos e frações foram determinados por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), em sistema Acquity™ (Waters, MA, USA), acoplada à espectrometria de massas (EM) de alta resolução (Xevo G2 QTof model), equipado com fonte de ionização eletro spray. Os dados foram adquiridos pelo software MassLynx v.4.1.

Adicionalmente à CLUE/EM, a identificação dos compostos majoritários foi realizada através de CLUE com detector de arranjo de diodos (DAD) em sistema Acquity™ (Waters, MA, USA), bomba quaternária, desgaseificador e injetor automático. Como amostras autênticas foram utilizadas as metilxantinas (cafeína e teobromina), os ácidos fenólicos (ácido clorogênico e ácido 4-*O*-cafeoilquínico), e o flavonoide (rutina). Todas as substâncias de referência foram adquiridas da Sigma-Aldrich® Co. (St. Louis, EUA). Foram quantificados os compostos cafeína, ácido clorogênico e rutina. Os resultados foram expressos em miligramas de composto por grama de extrato (mg composto/g extrato).

## 3.2. EXPERIMENTAÇÃO *IN VIVO*

### 3.2.1. ANIMAIS

No delineamento desta pesquisa foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas, com aproximadamente 1 mês de idade e peso entre 18-25 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais mencionados foram acomodados em gaiolas plásticas (40 x 32 cm) com serragem, em condições de temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luz controladas (ciclos claro/escuro de 12h) no Biotério Setorial. Receberam alimentação (ração) e água *ad libitum* em bebedouros e comedouros apropriados, trocados com frequência, durante todos os experimentos. Para a realização deste estudo, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

da UFSC sob protocolo nº PP00965, e os experimentos realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **3.2.2. MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGO**

O modelo experimental foi realizado de acordo com o protocolo proposto por Saleh, Calixto e Medeiros (1996).

No dia dos experimentos, à cavidade pleural de cada animal foi administrado 0,1 mL de solução salina estéril (NaCl, 0,9%, i.pl.) ou 0,1 mL do agente flogístico  $\lambda$ -carragenina (Cg, 1%, i.pl.) utilizando-se de uma seringa de insulina com agulha de 12,7x0,33 mm adaptada com cânula de poliestireno. Transcorridas 4 h de pleurisia, a morte indolor assistida dos animais foi realizada por overdose de pentobarbital (120 mg/kg, i.p.). Os animais foram afixados em mesa cirúrgica e através de incisão transversal na pele e músculos abdominais, o tórax foi exposto, o processo xifóide pinçado e o acesso a cavidade pleural foi feito por uma incisão na porção inferior do esterno. A cavidade pleural foi lavada com 1,0 mL de tampão fosfato salino (PBS, pH 7.2) (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) contendo heparina (20 UI/mL). O lavado obtido foi utilizado para a quantificação de leucócitos total e seu diferencial, exsudação, atividades enzimáticas de MPO e ADA, concentrações de NOx e das citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ).

Fazendo uso desse protocolo experimental, primeiramente foi realizada uma curva dose-resposta, a fim de se determinar quais as melhores doses a se trabalhar. Aos animais, foi administrado por via intravenosa (i.v) 0,1 mL do corante Azul de Evans (50 mg/kg) para posterior avaliação da exsudação. Após 10 min, o tratamento dos animais foi realizado por via oral (v.o.), utilizando agulha curva para gavagem em camundongos, onde diferentes grupos de animais receberam diferentes doses de extrato bruto padronizado (EB: 10-50 mg/kg), frações butanólica (BuOH: 0,1-10 mg/kg) ou residual aquosa (RAq: 0,1-10 mg/kg), ou ainda de seus compostos majoritários cafeína (Caf: 0,1-5 mg/kg), rutina (Rut: 0,01-1 mg/kg) ou ácido clorogênico (AcCl: 0,01-1 mg/kg). Decorridas 0,5 h, a pleurisia foi induzida e após 4 h os animais foram eutanasiados e então coletados os lavados pleurais para quantificação de

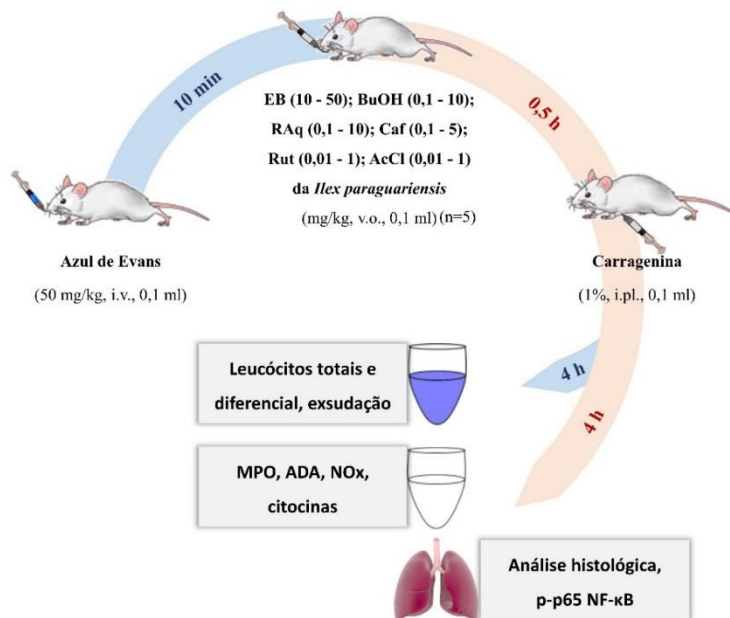
leucócitos totais, contagem diferencial e quantificação da concentração de exsudato (**Figura 7**).

Com a menor dose efetiva de EB (25 mg/kg) capaz de reduzir de forma significativa a migração leucocitária e a exsudação na cavidade pleural, uma curva tempo-resposta foi realizada a fim de verificar o melhor tempo de tratamento prévio à indução da pleurisia. Com esse objetivo, diferentes grupos de animais receberam o EB (25 mg/kg, v.o.) 0,5 h, 1h ou 2 h antes da aplicação da Cg. Da mesma forma, após 4 h os animais foram eutanasiados e o lavado coletado para avaliação dos parâmetros: contagem de leucócitos e exsudação. Após a realização destes experimentos, foi então selecionado o tempo de pré-tratamento de 0,5 h como mais efetivo.

De acordo com as doses selecionadas na curva dose-resposta e com o tempo de pré-tratamento selecionado na curva tempo resposta, prosseguiu-se o estudo visando a avaliação de outros parâmetros inflamatórios, tais como MPO, ADA, NOx, citocinas pró- e anti-inflamatórias, análise histológica dos pulmões e análise da fosforilação da subunidade p-p65 NF- $\kappa$ B. Para tanto, os animais não receberam o corante Azul de Evans visto que o mesmo pode interferir com as dosagens colorimétricas. Desta forma, diferentes grupos de animais receberam EB (25 mg/kg, v.o.), BuOH (1 mg/kg, v.o.), RAq (1 mg/kg, v.o.), Caf (5 mg/kg, v.o.), Rut (1 mg/kg, v.o.) ou AcCl (0.1 mg/kg, v.o.) e, transcorridas 0,5 h, induziu-se a pleurisia com Cg. Passadas as 4 h da pleurisia, os animais foram eutanasiados e o lavado pleural, bem como o tecido pulmonar, foram coletados (**Figura 07**).

Todos os experimentos foram acompanhados de grupos controle positivo e negativo. No grupo controle positivo (Cg), os animais receberam apenas a administração da Cg (1%, i.pl.), já o controle negativo (Sal) os animais receberam apenas a administração de solução salina estéril (0,9%, i.pl.). Além disso, outro grupo de animais foi tratado previamente com o fármaco de referência anti-inflamatória, dexametasona (Dex: 0,5 mg/kg, v.o.)

**Figura 7 - Esquema da curva dose-resposta utilizando modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.**



AcCl: ácido clorogênico; ADA: adenosina desaminase; BuOH: fração butanólica; Caf: cafeína; EB: extrato bruto padronizado de *I. paraguariensis*; i.pl.: via intra-pleural; i.v.: via intravenosa; MPO: mieloperoxidase; NOx: metabólitos do óxido nítrico; RAq: fração residual aquosa; p-p65 NF-κB: subunidade p65 fosforilada do fator de transcrição nuclear kappa B; Rut: rutina; v.o.: via oral.  
Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.2.3. PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Quando necessária a administração do corante Azul de Evans, os animais foram previamente anestesiados com xilasina (15 mg/kg, i.p.) e quetamina (75 mg/kg, i.p.). Decorridas as 4 h do modelo da pleurisia, os animais foram submetidos à morte indolor assistida através de uma overdose de xilasina (45 mg/kg, i.p.) e quetamina (225 mg/kg, i.p.).

### **3.2.4. QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS E DIFERENCIAL CELULAR**

Para a quantificação dos leucócitos totais nas amostras de lavado pleural foi utilizado contador hematológico veterinário (MINDRAY, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China). Para a contagem diferencial entre polimorfonucleares e mononucleares, alíquotas (50  $\mu$ L) das amostras foram submetidas à citocentrifugação (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, EUA) e então coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa. Os resultados foram expressos como total de células por mililitro de amostra ( $\times 10^6$  cél/mL).

### **3.2.5. COLORAÇÃO DOS ESFREGAÇOS CELULARES**

As lâminas confeccionadas após citocentrifugação foram secas à temperatura ambiente e posteriormente coradas pela técnica utilizando eosinato de azul de metileno (May-Grünwald) e azul-eosina (Giemsa). Em suporte apropriado, foi adicionado a cada lâmina 1 mL de corante May-Grünwald mantido em contato com o sedimento celular por 2 min e, em seguida, adicionou-se 1 mL de água deionizada. Transcorridos 3 min, o corante foi removido e então adicionou-se o corante Giemsa (1:20), que recobriu as lâminas por 15 min. Ao término desse tempo, as lâminas foram lavadas em água deionizada e secas à temperatura ambiente.

### **3.2.6. QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE EXSUDATO**

A quantificação do extravasamento vascular foi feita através da mensuração da quantidade de corante Azul de Evans no lavado da cavidade pleural, uma vez que o mesmo tem por característica ligar-se às proteínas plasmáticas, principalmente a albumina. Para tanto, as amostras coletadas dos animais tratados previamente com tal corante foram centrifugadas a 300 x g por 5 min (Sorvall™ ST 40, ThermoScientific®, Swedesboro, Nova Jersey, EUA), e uma alíquota (200  $\mu$ L) do sobrenadante obtido foi transferida para uma placa de ELISA de 96 poços. Com o auxílio de um leitor de placas

de ELISA (Organon Teknika, Roseland, Nova Jersey, EUA), a quantificação colorimétrica foi realizada em 620 nm e através de interpolação com uma curva padrão (0,01 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ), os resultados foram expressos por micrograma de corante por mililitro de amostra ( $\mu\text{g/mL}$ ).

### **3.2.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)**

Para a avaliação dos efeitos do material vegetal sobre a atividade da enzima MPO, foi utilizada a metodologia *in-house* previamente descrita (BRADLEY et al., 1982; RAO et al., 1993). Imediatamente após a coleta do lavado pleural, alíquotas (100  $\mu\text{L}$ ) foram tratadas com 100  $\mu\text{L}$  de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB 0,5%) e submetidas a três ciclos de vórtex/*freeze-thaw* e posteriormente à centrifugação (40000  $\times$  g por 15 min a 4 °C) (Sorvall TM ST 40, ThermoScientific®, Swedesboro, Nova Jersey, EUA). Utilizando uma placa de ELISA, foram transferidos 20  $\mu\text{L}$  de sobrenadante e adicionados 180  $\mu\text{L}$  de meio de reação (0,167 mg/mL dihidrocloreto de *o*-dianisidina 2 HCl e 0,0005 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a cada poço. As amostras foram incubadas por 15 min a 37 °C, e a reação interrompida pela adição de 15  $\mu\text{L}$  de solução de azida ( $\text{NaN}_3$  1 %). A MPO converte o  $\text{H}_2\text{O}_2$  do meio de reação em radicais oxigênio. Esses combinam-se com a *o*-dianisidina, oxidando-a e formando um composto de coloração amarela. A quantificação colorimétrica foi realizada em 450 nm com auxílio de leitor de placa de ELISA (Organon Teknika, Roseland, Nova Jersey, EUA) e, através da interpolação com uma curva padrão (0,7 a 140 mU/mL) a atividade da MPO foi estimada e expressa em mU/mL.

### **3.2.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ADENOSINA DESAMINASE (ADA)**

A quantificação da atividade de ADA foi realizada como descrito por Giusti e Galanti (1984). As amostras de lavado pleural foram coletadas, centrifugadas (300  $\times$  g por 5 min a 4 °C (Sorvall TM ST 40, ThermoScientific®, Swedesboro, Nova Jersey, EUA), e alíquotas (10  $\mu\text{L}$ ) dos sobrenadantes foram transferidas para tubos onde a reação enzimática teve início através da adição de 250

$\mu\text{L}$  de solução de fosfato de adenosina (35 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 15 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , 15 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 0,5 mM adenosina). Após 1 h de incubação a 37 °C, a reação foi interrompida pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de solução de fenol (1 mM  $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ) com nitroprussiato de sódio (0,17 mM  $\text{C}_5\text{FeN}_5\text{Na}_2\text{O} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) e 500  $\mu\text{L}$  de solução alcalina de hipoclorito de sódio (11 mM  $\text{NaOCl}$ , 125 mM  $\text{NaOH}$ ) a cada tubo. Decorridas 0,5 h de incubação a 37 °C, 200  $\mu\text{L}$  das amostras foram transferidas para poços de placa de ELISA. A ADA, clivando a adenosina, tem como produto de reação a inosina e amônia. Essa por sua vez, reage com o fenol em pH alcalino, sendo a reação catalisada pelo nitroprussiato de sódio, gerando um indofenol de cor azul. A quantificação do indofenol é diretamente proporcional a amônia formada e, conseqüentemente, a atividade de ADA. Uma solução de sulfato de amônio (35 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 15 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  e 15 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) foi utilizada, em triplicata como padrão de concentração 20 U/L. A quantificação colorimétrica proporcional a atividade enzimática foi mensurada em 620 nm utilizando leitor de placa de ELISA (Organon Teknika, Roseland, Nova Jersey, EUA) e os resultados foram expressos em U/L.

### 3.2.9. QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DO ÓXIDO NÍTRICO ( $\text{NO}_x$ )

A determinação indireta dos níveis de NO foi realizada através da quantificação de seus metabólitos -  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  - utilizando a reação de Griess (GREEN et al., 1982; MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). Alíquotas (300  $\mu\text{L}$ ) do lavado pleural foram desproteinizadas pela adição de 30  $\mu\text{L}$  de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ , 20 %) seguidas de banho de gelo por 1 h. Após isso, 6  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ , 2,5 N) foram incorporados às amostras seguidas de centrifugação (2500 rpm por 15 min). Na seqüência, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e 200  $\mu\text{L}$  de solução contendo reagente de Griess (mistura (1:1) de sulfanilamida ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ , 1%) e N-(1-naftil) etilenoediamina ( $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$ , 0,1%) e cloreto de vanádio III diluído em HCl 1M ( $\text{VCl}_3$ , 0,8%) foram adicionados à placa de ELISA. As amostras foram incubadas por 40 min a 37 °C e, com auxílio de leitor de placas de ELISA (Organon Teknika, Roseland, Nova Jersey, EUA), a leitura das densidades óticas foi feita em 540 nm. A reação com  $\text{VCl}_3$  proporciona a conversão de



$\text{NO}_3^-$  em  $\text{NO}_2^-$ . O  $\text{NO}_2^-$  total reage com a solução de Griess e o produto gerado possui coloração rósea. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de  $\text{NO}_2^-$  (0-100  $\mu\text{M}$ ) foi estabelecida e, através de interpolação com a equação da reta, foi possível a quantificação de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  nas amostras. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$ .

### **3.2.10. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ E IFN- $\gamma$ )**

A determinação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no lavado pleural dos camundongos foi feita utilizando o *kit* comercial Mouse Th1/Th2/Th17 CBA (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA) para a detecção de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 e IFN- $\gamma$ . A quantificação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Curvas de calibração foram feitas usando uma série de padrões diluídos sucessivamente (0-5000 pg/mL). Uma suspensão de *beads* de captura foi feita a partir de reagentes respectivos a cada citocina. Após isso, à cada 50  $\mu\text{L}$  de amostra ou padrão foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de *beads* de captura e 50  $\mu\text{L}$  do anticorpo de detecção conjugado com ficoeritrina. Após incubação ao abrigo da luz por 2 h, as amostras foram lavadas com 1,0 mL de tampão de lavagem, centrifugadas (200  $\times$  g por 5 min) e o *pellet* ressuspense em 300  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem. As amostras foram adquiridas usando citômetro de fluxo BD FACSVerse (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA), analisadas pelo software FCAP Array v3.0 e os resultados expressos em pg/mL.

A quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$  foi realizada através de um *kit* de ELISA disponível com o anticorpo monoclonal específico (eBioscience, Inc, San Diego, Califórnia, EUA). Todo o ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, a leitura das absorbâncias foi obtida em 450 nm com auxílio de uma leitora de placa de ELISA (Organon Teknika, Roseland, Nova Jersey, EUA) e a concentração de citocina foi estimada através de interpolação com uma curva padrão (8,0-1000 pg/mL).

### 3.2.11. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os tecidos pulmonares foram obtidos após a eutanásia dos camundongos - 4 horas após a administração da Cg - lavados em PBS e fixados em solução de formalina 10 % (v/v) por 48 horas. Os tecidos foram desidratados através de uma série de soluções de etanol de crescentes concentrações seguidas de xileno, incluídos em parafina e foram realizados cortes de 3  $\mu\text{m}$  (LEICA-Instruments CM3050, Nussloch, Alemanha). Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina e analisados sob microscópio óptico comum (200 x). A classificação do parâmetro histológico foi feita utilizando *scores* de acordo com estudo previamente reportado (LIU et al., 2014). Dessa forma, os *scores* utilizados foram: 0= normal; 1= aumento de espessura em menos de 50% de septos interalveolares (SIA) devido a edema e/ou a infiltração de neutrófilos; 2= aumento da espessura em mais de 50% de SIA; 3= aumento da espessura em mais de 50% de SIA e presença de neutrófilos no interior do espaço alveolar; e 4= infiltração de neutrófilos consolidada com distorção da arquitetura alveolar normal. A pontuação média foi relatada para cada seção microscópica.

### 3.2.12. AVALIAÇÃO DA SUBUNIDADE p65 FOSFORILADA (p-p65 NF- $\kappa$ B)

Para avaliar os efeitos dos compostos majoritários da *I. paraguariensis* sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B, o tecido pulmonar dos camundongos foi coletado após a eutanásia dos mesmos. A quantidade total de proteínas foi mensurada pelo método de Lowry e as amostras ajustadas para 60  $\mu\text{g}$  proteína (LOWRY et al., 1951). A quantificação de p-p65 NF- $\kappa$ B foi feita utilizando *kit* comercial (PathScan<sup>®</sup> Phospho-NF- $\kappa$ B p65 Ser536, Cell Signalling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, EUA), e procedeu-se de acordo com as instruções do fabricante. Logo após a coleta das amostras, as mesmas foram conservadas a -80 °C até o momento das análises, e à elas foi adicionado um coquetel de inibidores de fosfatases e proteases presente no *kit* comercial anteriormente descrito. As quantificações colorimétricas foram realizadas através de leitor de placa de ELISA (Organon Teknika, Roseland, Nova Jersey, EUA) em 450 nm. Os resultados foram

expressos como mudança relativa comparadas ao grupo controle negativo (Sal), que representou a expressão basal de fosforilação dessa proteína (ARRUDA-SILVA et al., 2014).

### 3.2.13. 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-  $\lambda$  (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), xileno, (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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); dihidrocloro de N-(1-naftil)-etilenodiamina (Merck, Darmstadt, Bundesland, Alemanha). Outros sais e reagentes, de grau de pureza analítica, foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

### 3.2.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados foram expressos através da média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) para valores absolutos e também em percentuais de inibição. Diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e os grupos tratados foram realizados por meio da análise de variância ANOVA de uma via (*one-way* ANOVA), complementada pelo pós-teste de Newman-Keuls através do programa de estatística GraphPadPrism® Versão 5.02 (San Diego, Califórnia, EUA). Os teores dos compostos presentes no extrato foram expressos por média  $\pm$  desvio padrão (D.P) e analisados por ANOVA complementada por Tukey. Para todas as análises estatísticas, valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.



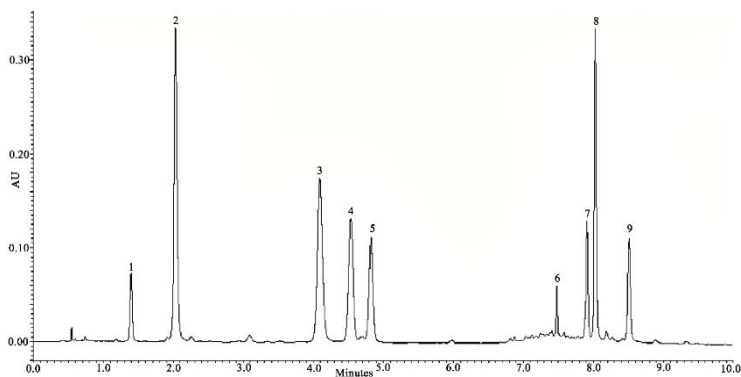
## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

A Figura 8 demonstra o cromatograma do extrato bruto das folhas de *I. paraguariensis*, com detecção em 280 nm, enquanto que a Figura 9 expõe a sobreposição dos cromatogramas de extrato bruto e frações de *I. paraguariensis* obtidos por CLUE/DAD em 280 nm.

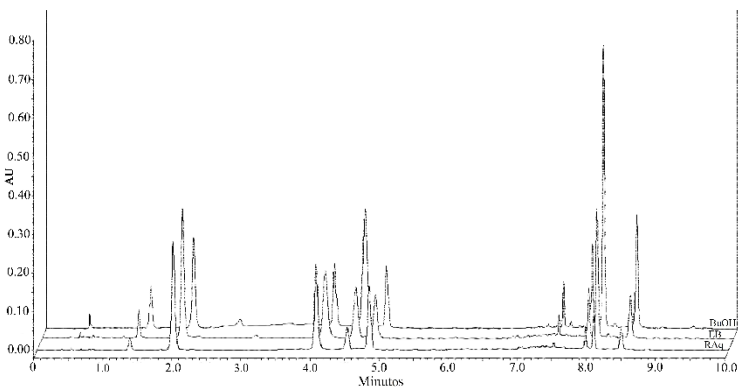
Podemos facilmente identificar nove picos majoritários neste cromatograma, os quais foram posteriormente identificados através de metodologias analíticas. Os teores de metilxantinas e compostos fenólicos no extrato e nas frações estão expostos na Tabela 01.

**Figura 8 - Cromatograma do extrato bruto das folhas de *Ilex paraguariensis* por CLUE/DAD com detecção em 280 nm.**



1, teobromina; 2, ácido 3-*O*-cafeoilquínico; 3, ácido 5-*O*-cafeoilquínico; 4, cafeína; 5, ácido 4-*O*-cafeoilquínico; 6, rutina; 7, ácido 3,4-dicafeoilquínico; 8, ácido 3,5-dicafeoilquínico, e 9, ácido 4,5-dicafeoilquínico.

**Figura 9 - Sobreposição de cromatogramas do extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis* obtidos por CLUE/DAD em 280 nm**



Condições cromatográficas: gradientes A (ácido fórmico/água, pH: 2,5) e B (acetonitrila) programados: 0-5 min, variação linear de A-B (97: 3 v/v) a A-B (90:10 v/v); 5-6 min, isocrática A-B (90:10 v/v); 6-9 min, variação linear A-B (80:20 v/v), e 9-10 min, variação linear A-B (10:90 v/v). Fluxo 0,3 mL/min, coluna Waters BEH C18 (1,7  $\mu$ m, 50  $\times$  2,1 mm), detecção 280 nm, volume de injeção 5  $\mu$ L.

**Tabela 1 - Teores de compostos fenólicos e metilxantinas nos extratos/frações (mg/g).**

Amostra	Cafeína	Ácido Clorogênico	Rutina
EB	29,3 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	67,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	12,4 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
BuOH	101,7 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	58,4 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	42,0 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
RAq	3,9 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	68,3 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	2,2 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>

Os dados são valores média  $\pm$  D.P expressos em mg/g extrato (N= 3).

Letras diferentes indicam diferença significativa dentro das colunas (ANOVA e Tukey's post test, P<0.05).

#### 4.2. EFEITOS DA *I. paraguariensis* SOBRE O INFLUXO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO

Quando comparado ao grupo controle positivo (Cg), o EB foi capaz de diminuir significativamente o conteúdo leucocitário na cavidade pleural (% inibição: 10 mg/kg:  $45,48 \pm 4,28$ ; 25 mg/kg:  $49,15 \pm 1,64$  e 50 mg/kg:  $52,26 \pm 2,49$ ) ( $P < 0,01$ ) devido a sua capacidade de inibir a migração de neutrófilos (% inibição: 10 mg/kg:  $65,32 \pm 4,66$ ; 25 mg/kg:  $62,29 \pm 4,54$  e 50 mg/kg:  $60,25 \pm 2,90$ ) ( $P < 0,01$ ). Além disso, o EB também teve efeito significativo sobre a concentração de exsudato (% inibição: 25 mg/kg:  $26,73 \pm 4,05$  e 50 mg/kg:  $29,27 \pm 4,52$ ) ( $P < 0,01$ ) (**Figura 10**).

Dentre as frações derivadas do EB, a BuOH mostrou efeito inibitório sobre a migração de leucócitos (% inibição: 1 mg/kg:  $54,80 \pm 1,94$  e 10 mg/kg:  $55,37 \pm 3,08$ ) ( $P < 0,01$ ), o influxo de neutrófilos (% inibição: 0,1 mg/kg:  $24,15 \pm 6,26$ ; 1 mg/kg:  $61,39 \pm 1,76$  e 10 mg/kg:  $61,91 \pm 3,38$ ) ( $P < 0,01$ ) e também sobre a exsudação (% inibição: 0,1 mg/kg:  $20,59 \pm 5,61$ ; 1 mg/kg:  $21,10 \pm 3,96$  e 10 mg/kg:  $26,77 \pm 2,90$ ) ( $P < 0,01$ ) (**Figura 11**).

A fração RAq também foi efetiva em reduzir o número total de leucócitos (% inibição: 0,1 mg/kg:  $46,89 \pm 9,35$ ; 1 mg/kg:  $54,24 \pm 8,84$  e 10 mg/kg:  $38,14 \pm 5,77$ ) ( $P < 0,01$ ), às custas de neutrófilos (% inibição: 0,1 mg/kg:  $57,78 \pm 4,75$ ; 1 mg/kg:  $68,20 \pm 2,64$  e 10 mg/kg:  $49,68 \pm 2,97$ ) ( $P < 0,01$ ), e também teve impacto sobre o conteúdo plasmático extravasado (% inibição: 1 mg/kg:  $31,21 \pm 5,87$  e 10 mg/kg:  $25,62 \pm 2,44$ ) ( $P < 0,01$ ) (**Figura 12**).

Os compostos majoritários da *I. paraguariensis* testados nesse estudo também demonstraram potenciais propriedades anti-inflamatórias. Primeiramente, o composto majoritário Caf foi capaz de inibir de maneira significativa o conteúdo leucocitário (% inibição: 1 mg/kg:  $40,96 \pm 5,86$  e 5 mg/kg:  $50,28 \pm 3,76$ ) ( $P < 0,01$ ) devido sua ação sobre a migração de neutrófilos (% inibição: 0,1 mg/kg:  $47,07 \pm 1,03$ ; 1 mg/kg:  $55,38 \pm 4,28$  e 5 mg/kg:  $67,78 \pm 2,01$ ) ( $P < 0,01$ ). Contudo, esse composto mostrou significativa atividade sobre a exsudação plasmática somente quando administrado na dose de 5 mg/kg (% inibição:  $23,17 \pm 8,74$ ) ( $P < 0,05$ ) (**Figura 13**).

O composto Rut, diminuiu significativamente o influxo leucocitário (% inibição: 0,01 mg/kg:  $36,44 \pm 4,19$ ; 0,1 mg/kg:  $38,42 \pm 8,32$  e 1 mg/kg:  $46,61 \pm 5,58$ ) ( $P < 0,01$ ) às custas de

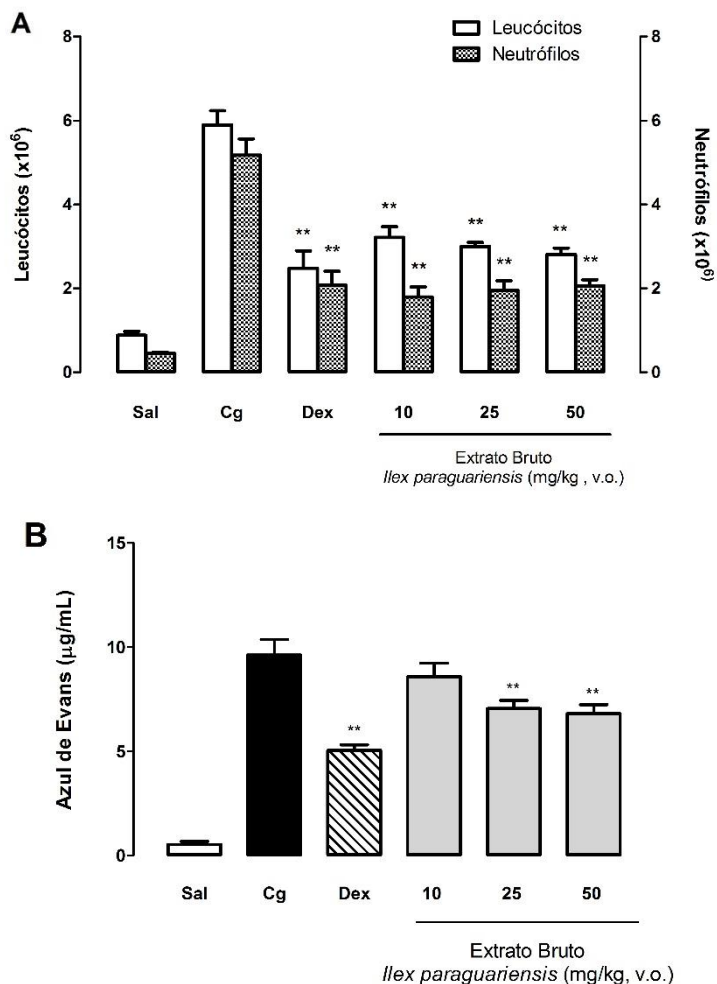
neutrófilos (% inibição: 0.01 mg/kg:  $49,36 \pm 3,47$ ; 0,1 mg/kg:  $62,10 \pm 1,27$  e 1 mg/kg:  $55,37 \pm 3,39$ ) ( $P < 0,01$ ), e além disso, também demonstrou perfil inibitório sobre a concentração de exsudato (% inibição: 0,1 mg/kg:  $17,17 \pm 2,91$  e 1 mg/kg:  $28,77 \pm 3,51$ ) ( $P < 0,05$ ) (**Figura 14**).

De maneira semelhante, o composto majoritário AcCl teve significativo efeito inibitório sobre a migração leucocitária (% inibição: 0,1 mg/kg:  $48,59 \pm 5,47$  e 1 mg/kg:  $48,14 \pm 4,27$ ) ( $P < 0,01$ ), bem como sobre o influxo de neutrófilos (% inibição: 0,01 mg/kg:  $49,70 \pm 2,45$ ; 0,1 mg/kg:  $66,29 \pm 5,97$  e 1 mg/kg:  $65,53 \pm 2,38$ ) ( $P < 0,01$ ) e a exsudação (% inibição: 0,1 mg/kg:  $23,59 \pm 2,37$  e 1 mg/kg:  $22,20 \pm 4,35$ ) ( $P < 0,05$ ) (**Figura 15**). Como esperado, o fármaco de referência Dex na dose testada, apresentou seu efeito anti-inflamatório proporcionando redução significativa sobre o conteúdo leucocitário na cavidade pleural (% inibição:  $57,91 \pm 6,99$ ) ( $P < 0,01$ ), sobre a migração de neutrófilos (% inibição:  $59,82 \pm 6,32$ ) ( $P < 0,01$ ) e também sobre a exsudação (% inibição:  $47,60 \pm 2,82$ ) ( $P < 0,01$ ).

Após a realização da curva dose-resposta, onde se determinou a menor dose de EB capaz de reduzir de forma significativa à migração leucocitária e a exsudação na cavidade pleural (25 mg/kg), seguiu-se a verificação do melhor tempo para pré-tratamento dos animais (curva tempo resposta). Nestes experimentos, foi verificado que o melhor tempo de pré-tratamento com o EB, se deu quando o extrato foi administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia, sendo então esse período utilizado em todos os experimentos posteriores com o material vegetal (**Figura 16**).

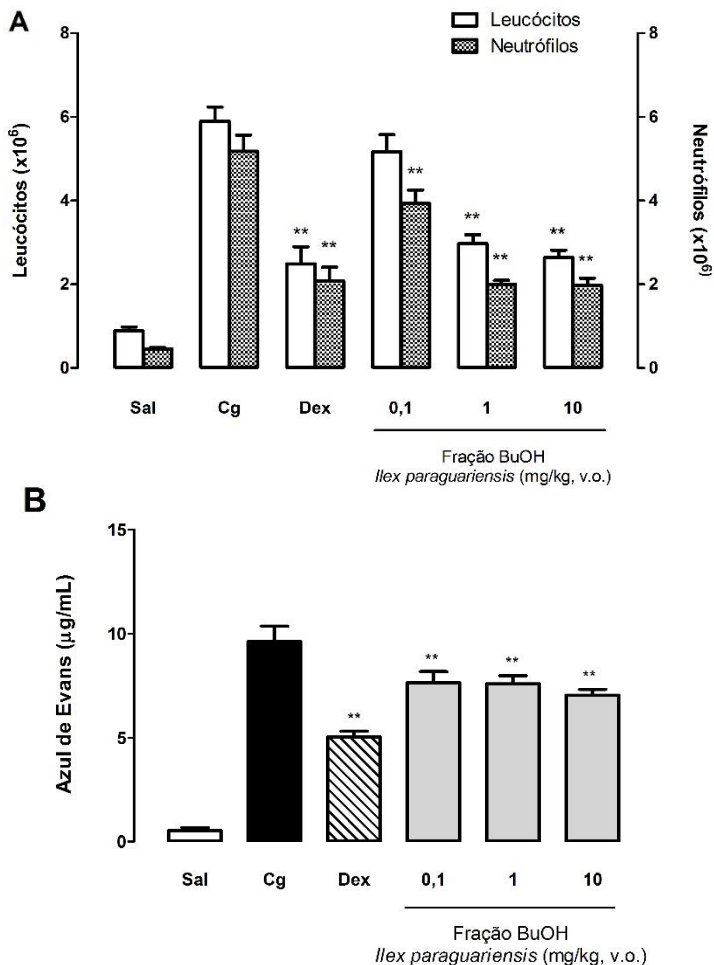


**Figura 10 - Efeito do extrato bruto (EB) da *Ilex paraguariensis* sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (A) e exsudação (B).**



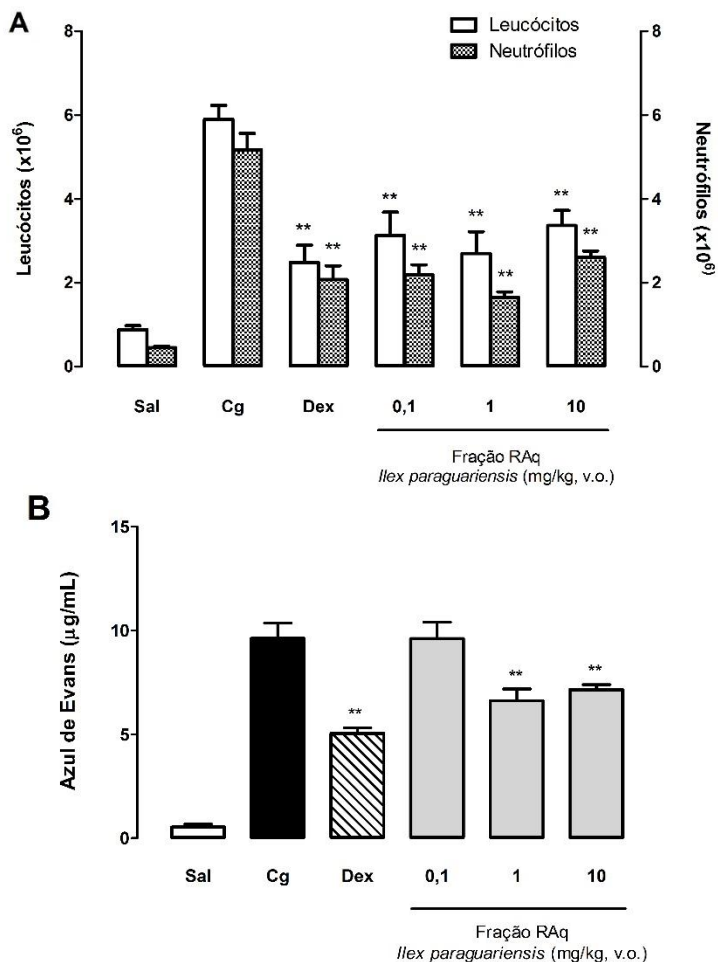
Efeito do extrato bruto (EB) da *I. paraguariensis* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. \*\* P<0,01.

**Figura 11 - Efeito da fração butanólica (BuOH) da *Ilex paraguariensis* sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (A) e exsudação (B).**



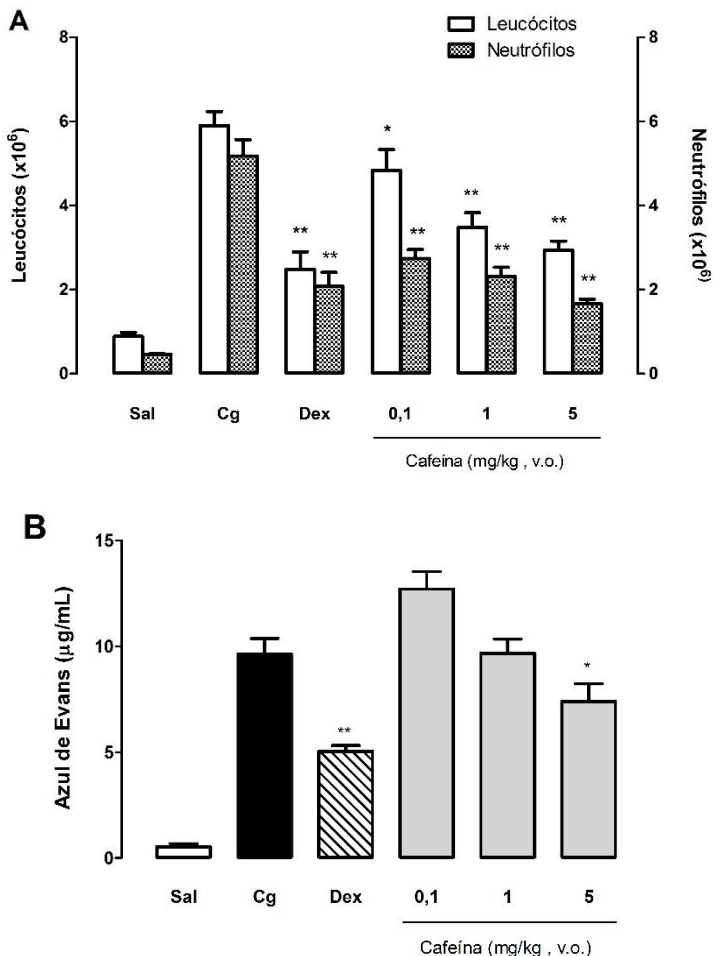
Efeito da fração butanólica (BuOH) da *I. paraguariensis* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. \*\* P<0,01.

**Figura 12 - Efeito da fração residual aquosa (RAq) da *Ilex paraguariensis* sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (A) e exsudação (B).**



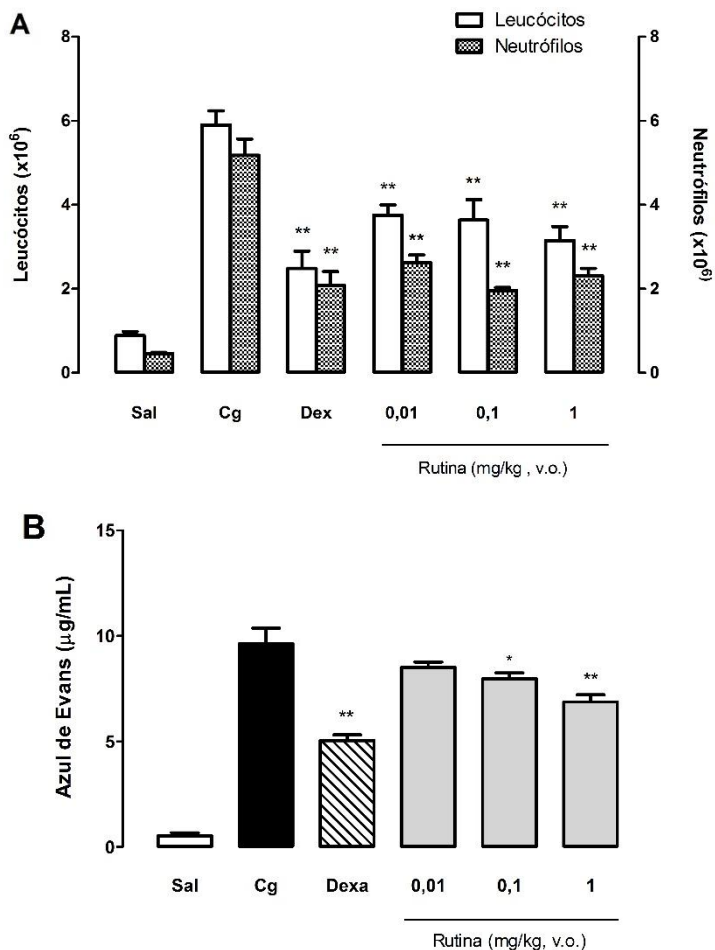
Efeito da fração residual aquosa (RAq) da *I. paraguariensis* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. \*\* P<0,01.

**Figura 13 - Efeito do composto majoritário cafeína (Caf) sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (A) e exsudação (B)**



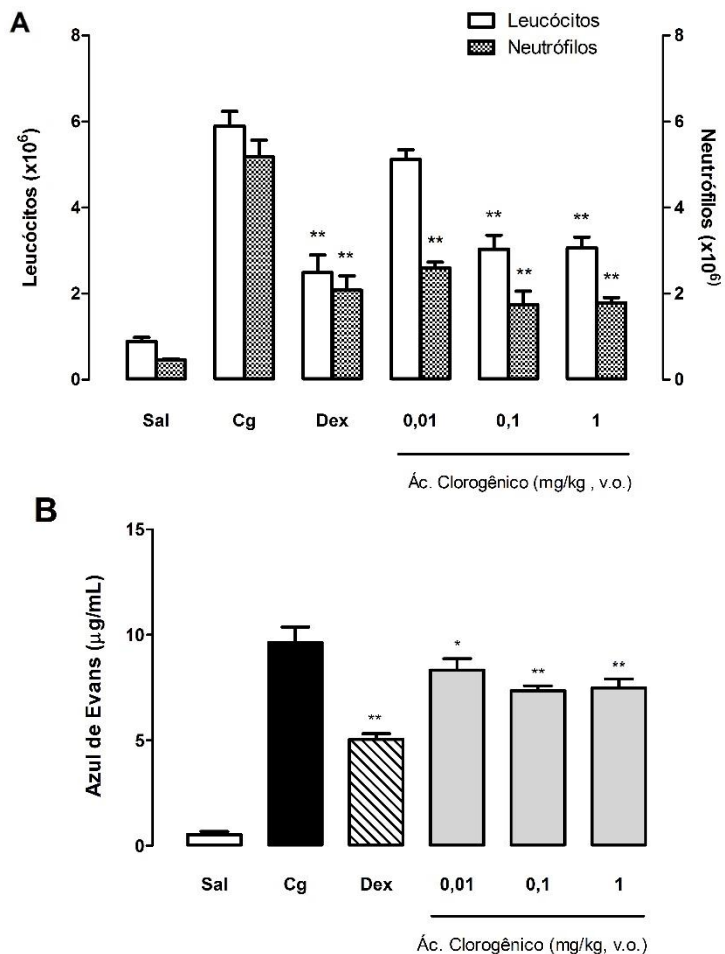
Efeito do composto majoritário cafeína (Caf) administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. \*\* P<0,01, \*P<0,05

**Figura 14 - Efeito do composto majoritário rutina (Rut) sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (A) e exsudação (B)**



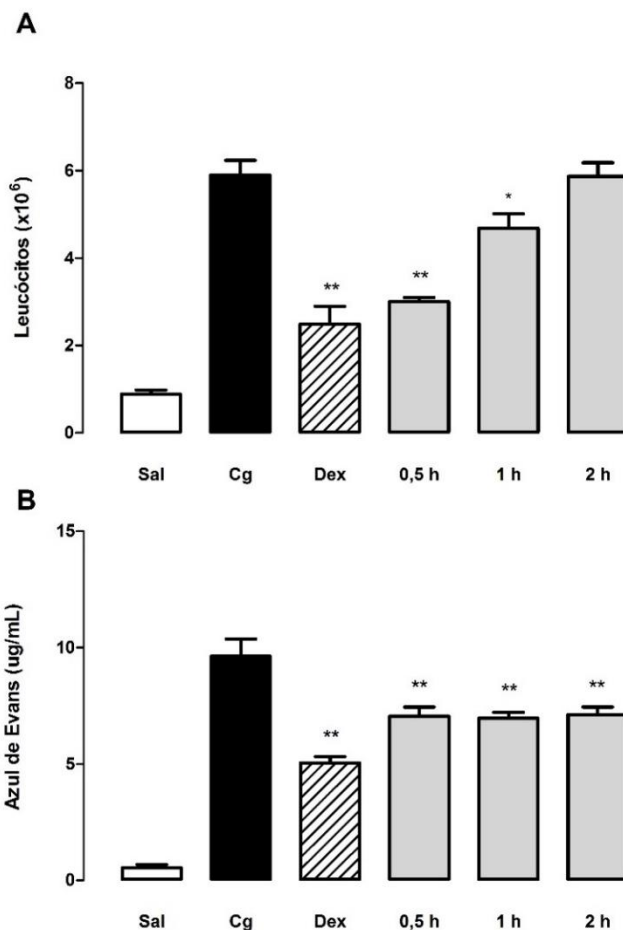
Efeito do composto majoritário rutin (Rut) administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. \*\* P<0,01, \*P<0,05.

**Figura 15 - Efeito do composto majoritário ácido clorogênico (AcCl) sobre a migração total de leucócitos (A), neutrófilos (A) e exsudação (B)**



Efeito do composto majoritário ácido clorogênico (AcCl) administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ .

**Figura 16 - Curva tempo-resposta do extrato bruto (EB 25 mg/kg) de *Ilex paraguariensis* no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos.**



Avaliação do melhor tempo de pré-tratamento dos animais utilizando o extrato bruto (EB 25 mg/kg) sobre migração de leucócitos totais (A) e exsudação (B). Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.); Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. \*\* P<0,01, \* P<0,05.

### 4.3. EFEITOS DA *I. paraguariensis* SOBRE MPO E ADA

As doses de EB (25 mg/kg), BuOH (1 mg/kg), RAq (1 mg/kg), Caf (5 mg/kg), Rut (1 mg/kg) e AcCl (0,1 mg/kg) foram selecionadas com base nos resultados acima descritos, e utilizadas para avaliar os potenciais efeitos da erva-mate sobre as atividades da MPO e da ADA uma vez que essas enzimas estão relacionadas a ativação e transmigração leucocitária.

Todos os grupos tratados demonstraram efeito significativo sobre as atividades da MPO (% inibição do EB:  $30,29 \pm 4,58$ ; BuOH:  $28,73 \pm 1,74$ ; RAq:  $24,94 \pm 4,52$ ; Caf:  $37,21 \pm 2,51$ ; Rut:  $29,01 \pm 4,93$  e AcCl:  $30,29 \pm 4,78$ ) ( $P < 0,01$ ) (**Figura 17**), e da ADA (% inibição do EB:  $29,00 \pm 11,97$ ; BuOH:  $41,93 \pm 0,73$ ; RAq:  $49,56 \pm 4,22$ ; Caf:  $38,11 \pm 11,26$ ; Rut:  $51,25 \pm 11,02$  e AcCl:  $32,52 \pm 8,70$ ) ( $P < 0,05$ ) (**Figura 18**). Sob as mesmas condições experimentais, a Dex também foi capaz de inibir as atividades de MPO e ADA (% inibição:  $29,83 \pm 4,96$  e  $60,40 \pm 8,30$ , respectivamente) ( $P < 0,01$ ) (**Figura 17, 18**).

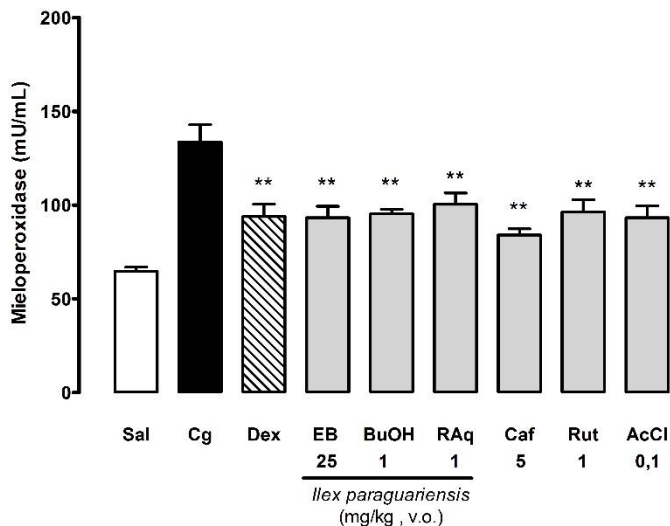
### 4.4. EFEITO DA *I. paraguariensis* SOBRE NO<sub>x</sub>

Tendo em vista a fina correlação entre níveis de NO e o fenômeno da de exsudação, a quantificação dos metabólitos NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi realizada a fim de confirmar a hipótese de que as reduções nas concentrações de exsudato observadas pelo tratamento com *I. paraguariensis* estão diretamente associadas aos menores níveis de NO.

Em nossos experimentos, foi observada redução significativa nos níveis de NO<sub>x</sub><sup>-</sup> em todos os grupos testados (% inibição do EB:  $43,71 \pm 3,40$ ; BuOH:  $61,11 \pm 2,23$ ; RAq:  $23,26 \pm 5,56$ ; Caf:  $45,30 \pm 5,50$ ; Rut:  $36,18 \pm 7,68$  e AcCl:  $35,34 \pm 4,36$ ) ( $P < 0,01$ ), bem como no grupo tratado com Dex (% inibição:  $54,12 \pm 2,54$ ) ( $P < 0,01$ ) (**Figura 19**).

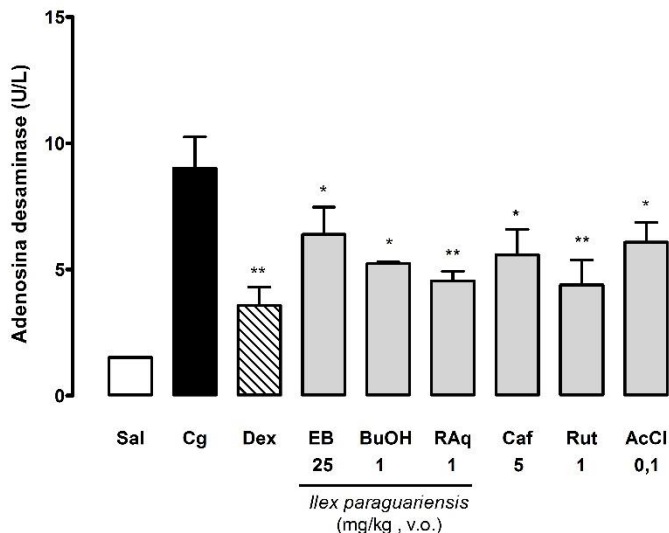


**Figura 17 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos majoritários da *Ilex paraguariensis* sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO)**



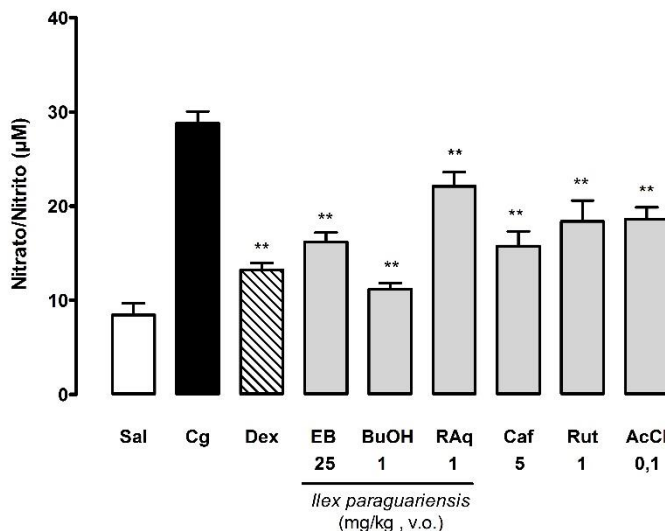
Efeito do EB (25 mg/kg), frações: BuOH (1 mg/kg), RAq (1 mg/kg), e compostos majoritários: Caf (5 mg/kg), Rut (1 mg/kg) e AcCl (0,1 mg/kg) administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. \*\* P<0,01.

**Figura 18 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos majoritários da *Ilex paraguariensis* sobre a atividade da adenosina desaminase (ADA)**



Efeito do EB (25 mg/kg), frações: BuOH (1 mg/kg), RAq (1 mg/kg), e compostos majoritários: Caf (5 mg/kg), Rut (1 mg/kg) e AcCl (0,1 mg/kg) administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. \*\* P<0,01, \* P<0,05.

**Figura 19 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos majoritários da *Ilex paraguariensis* sobre as concentrações dos metabólitos do óxido nítrico (NOx)**



Efeito do EB (25 mg/kg), frações: BuOH (1 mg/kg), RAq (1 mg/kg), e compostos majoritários: Caf (5 mg/kg), Rut (1 mg/kg) e AcCl (0,1 mg/kg) administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. \*\* P<0,01.

#### 4.5. EFEITOS DA *I. paraguariensis* SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS

Somados ao efeito anti-inflamatório associado a diminuição da migração leucocitária, exsudação, das atividades enzimáticas de MPO e ADA, bem como dos níveis de NOx, a *I. paraguariensis* demonstrou alterações importantes na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias no lavado pleural.

O EB, e as frações BuOH e RAq mostraram inibição significativa sobre as concentrações de IL-6 (% inibição do EB:  $91,63 \pm 1,05$ ; BuOH:  $76,10 \pm 2,97$  e RAq:  $40,75 \pm 0,95$ ) ( $P < 0,01$ ), IL-17A (% inibição do EB:  $66,57 \pm 1,32$ ; BuOH:  $38,94 \pm 3,13$  e RAq:  $46,44 \pm 9,55$ ) ( $P < 0,01$ ), IFN- $\gamma$  (% inibição do EB:  $48,67 \pm 1,30$ ; BuOH:  $47,94 \pm 10,66$  e RAq:  $42,95 \pm 2,85$ ) e também TNF- $\alpha$  (% inibição EB:  $23,20 \pm 6,27$ ; BuOH:  $55,27 \pm 9,26$  e RAq:  $17,25 \pm 3,29$ ) ( $P < 0,01$ ). (**Figura 20**). Além disso, EB e RAq foram capazes de aumentar a produção de IL-10 quando comparadas ao grupo controle positivo (% aumento do EB:  $42,38 \pm 30,43$ ; RAq:  $45,61 \pm 15,53$ ) ( $P < 0,05$ ) (**Figura 21**).

Os compostos majoritários estudados também demonstraram importantes efeitos sobre as citocinas estudadas. A Caf não foi eficaz em reduzir os níveis de IL-6 ( $P > 0,05$ ), entretanto, Rut demonstrou efeito significativo sobre os níveis dessa citocina (% inibição:  $64,19 \pm 1,59$ ) ( $P < 0,01$ ), enquanto AcCl causou uma redução massiva na concentração da IL-6, a valores abaixo do limite de detecção do kit ( $< 1,4$  pg/mL) ( $P < 0,01$ ) (**Figura 20**).

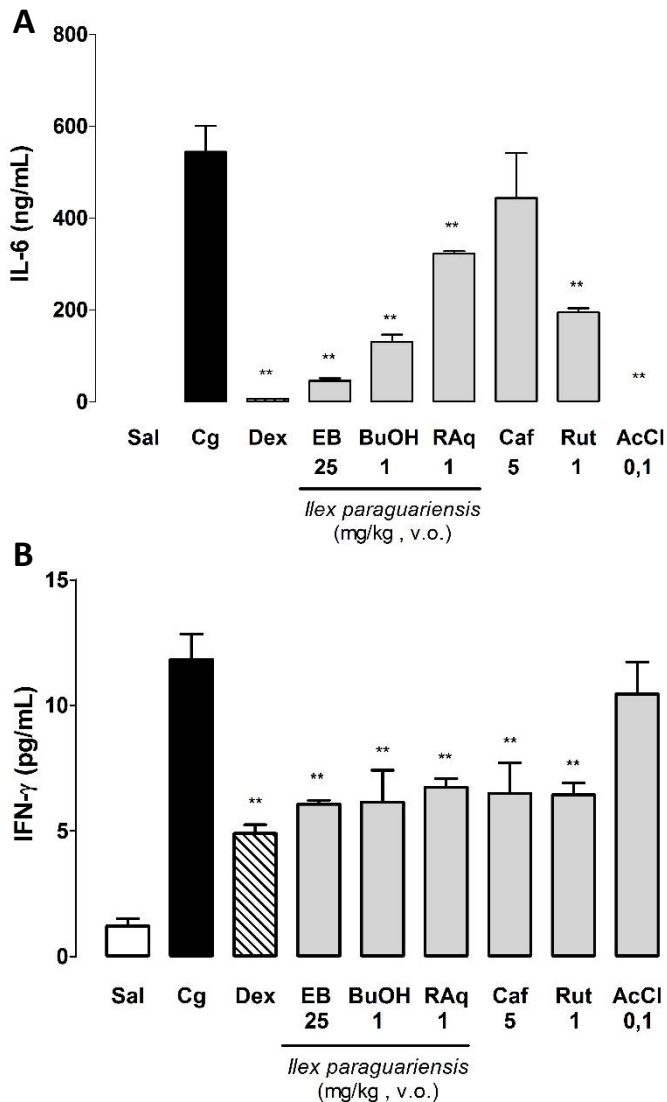
As concentrações de IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  também foram afetadas pelo pré-tratamento dos animais com Caf (% inibição: IL17A:  $38,84 \pm 5,42$ ; IFN- $\gamma$ :  $45,01 \pm 10,24$  e TNF- $\alpha$ :  $40,75 \pm 6,90$ ) ( $P < 0,01$ ) e Rut (% inibição: IL-17A:  $48,32 \pm 4,74$ ; IFN- $\gamma$ :  $45,54 \pm 4,10$  e TNF- $\alpha$ :  $28,56 \pm 2,19$ ) ( $P < 0,01$ ). Entretanto, a administração de AcCl promoveu a redução apenas das citocinas IL-17A e TNF- $\alpha$  a níveis significativos (% inibição IL-17A:  $18,24 \pm 3,85$  e TNF- $\alpha$ :  $39,24 \pm 3,55$ ) ( $P < 0,05$ ) (**Figura 20**).

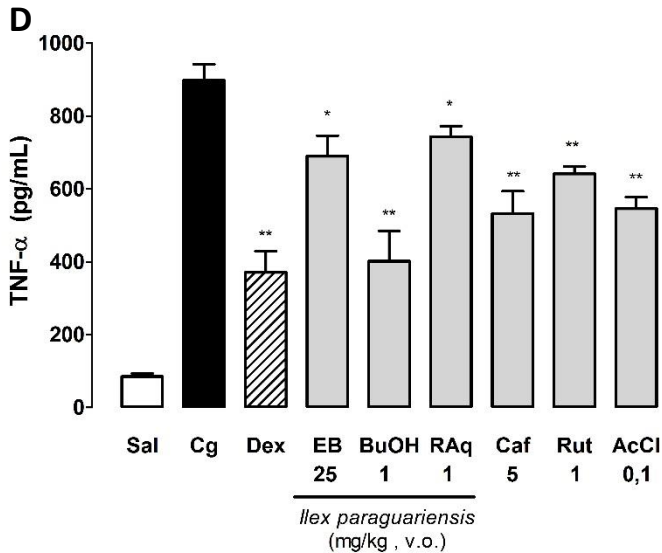
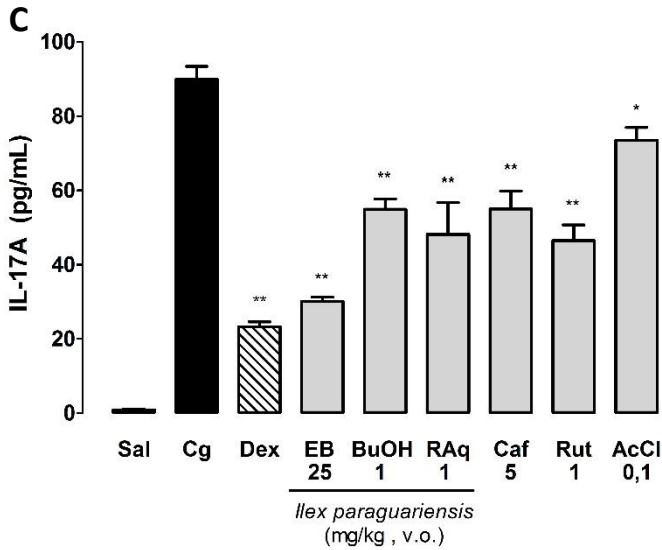
Em relação aos efeitos dos compostos majoritários sobre a concentração de IL-10, Rut e Caf não causaram alteração significativa em seus níveis ( $P > 0,05$ ). No entanto, AcCl proporcionou aumento significativo da concentração de IL-10 (% aumento:  $358,60 \pm 18,53$ ) ( $P < 0,05$ ) (**Figura 21**).

Como esperado, Dex exibiu um perfil inibitório sobre as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (% inibição sobre IL-6:  $98,96 \pm 0,17$ ; IL-17A:  $74,14 \pm 1,52$ ; IFN- $\gamma$ :  $58,52 \pm 2,93$  e TNF- $\alpha$ :  $47,68 \pm 1,24$ ) ( $P < 0,05$ ), e ao mesmo tempo aumentou os níveis de IL-10 (% aumento:  $83,62 \pm 19,97$ ) ( $P < 0,01$ ) (**Figura 20, 21**). Além disso, nenhum dos grupos (Sal, Cg, Dex, EB, BuOH, RAq, Caf, Rut ou AcCl) foi capaz de alterar as concentrações de IL-2 ou IL-4 (citocinas relacionadas a polarização Th2) para níveis detectáveis (Resultados não demonstrados), fato esperado, já que

o modelo experimental utilizado modula a resposta imune para Th1/Th17.

**Figura 20 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos majoritários da *Ilex paraguariensis* sobre os níveis das principais citocinas pró-inflamatórias.**

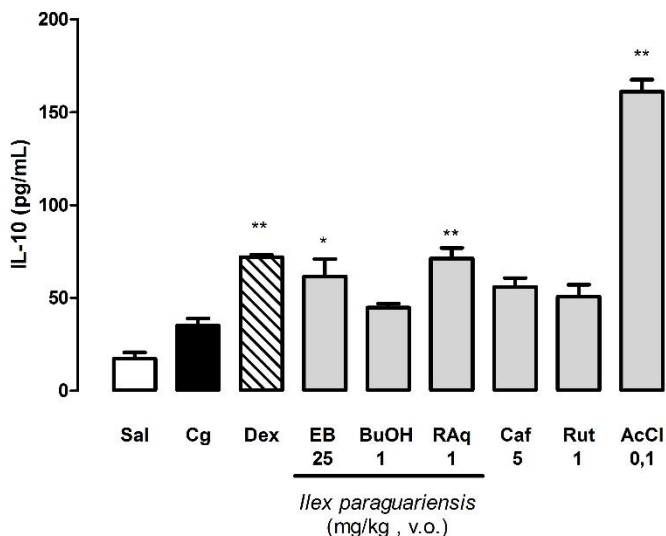




Efeito do EB (25 mg/kg), frações: BuOH (1 mg/kg), RAq (1 mg/kg), e compostos majoritários: Caf (5 mg/kg), Rut (1 mg/kg) e AcCl (0,1 mg/kg) administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos sobre os níveis de IL-6 (A), IFN- $\gamma$  (B), IL-17A (C) e TNF- $\alpha$  (D). Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais

tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. \*\* P<0,01, \* P<0,05.

**Figura 21 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos majoritários da *Ilex paraguariensis* sobre os níveis de interleucina 10 (IL-10)**

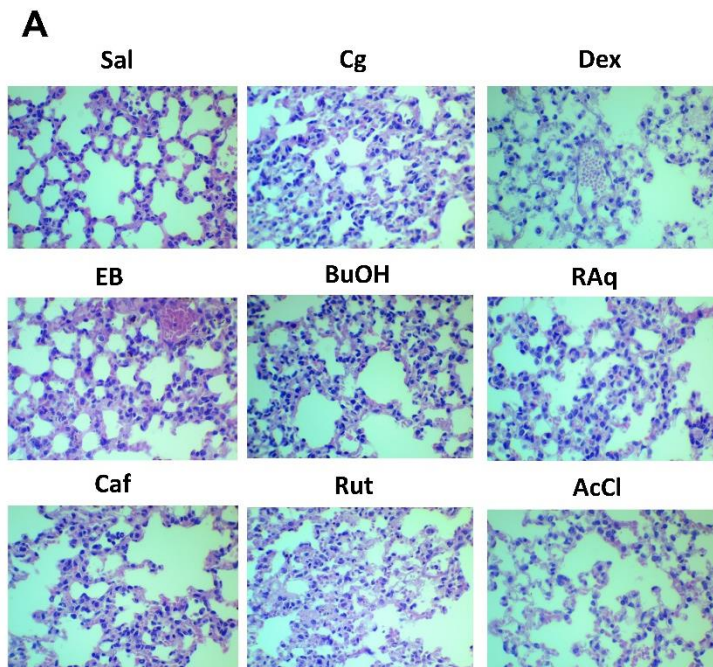


Efeito do EB (25 mg/kg), frações: BuOH (1 mg/kg), RAq (1 mg/kg), e compostos majoritários: Caf (5 mg/kg), Rut (1 mg/kg) e AcCl (0,1 mg/kg) administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. \*\* P<0,01, \* P<0,05.

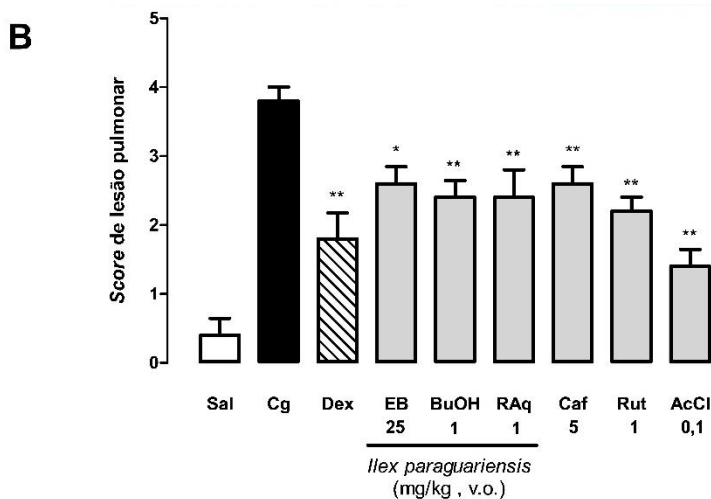
#### 4.6. EFEITOS DA ERVA-MATE SOBRE OS ASPECTOS HISTOLÓGICOS PULMONARES

A pleurisia induzida pela Cg promove um expressivo dano pulmonar com intensa infiltração neutrofílica na cavidade pleural, e significativa distorção da arquitetura alveolar normal. O pré-tratamento com EB, BuOH, RAq, Caf, Rut ou ainda AcCl administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia, diminuiu significativamente a espessura dos septos interalveolares e a infiltração de neutrófilos em relação ao grupo controle positivo (Cg) (% inibição do EB:  $31,58 \pm 6,45$ ; BuOH:  $36,84 \pm 6,45$ ; RAq:  $36,84 \pm 10,53$ ; Caf:  $31,58 \pm 6,45$ ; Rut:  $42,11 \pm 5,26$  e AcCl:  $63,16 \pm 6,45$ ) ( $P < 0,05$ ) (**Figura 22**). O pré-tratamento dos animais com Dex também reduziu as modificações histológicas promovidas pela carragenina de maneira significativa (% inibição:  $52,63 \pm 9,85$ ) ( $P < 0,01$ ) (**Figura 22**).

**Figura 22** - Efeito do extrato bruto, frações e compostos majoritários da *Ilex paraguariensis* sobre a lesão pulmonar







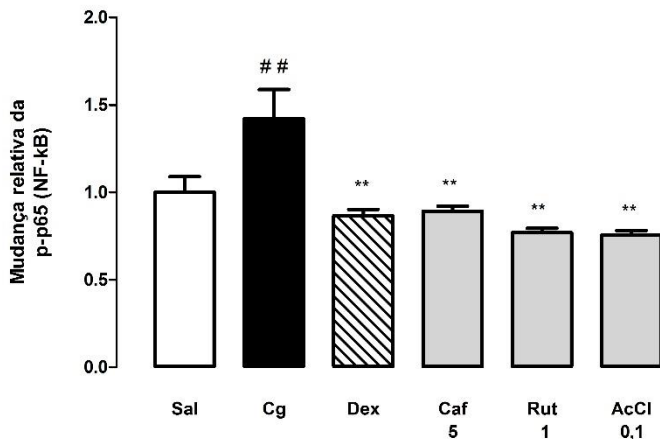
Efeito do EB (25 mg/kg), frações: BuOH (1 mg/kg), RAq (1 mg/kg), e compostos majoritários: Caf (5 mg/kg), Rut (1 mg/kg) e AcCl (0,1 mg/kg) administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. A) Imagens representativas do aspecto histológico dos tecidos pulmonares coletados. B) Gráfico dos *scores* atribuídos de acordo com o grau de lesão pulmonar. Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. \*\* P<0,01, \* P<0,05.

#### 4.7. EFEITO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DA *I. paraguariensis* SOBRE A FOSFORILAÇÃO DE p65 NF- $\kappa$ B.

Tendo em vista que a ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B, desempenha papel crucial na síntese de mediadores pró-inflamatórios, como a produção das citocinas pró-inflamatórias, a investigação da ação dos compostos majoritários sobre esta proteína também foi estudada. Em nossos experimentos, os compostos majoritários (Caf, Rut e AcCl) mostraram-se capazes de reduzir a fosforilação da subunidade p65. Da mesma forma, a Dex também demonstrou resultado similar quando comparados ao

grupo controle positivo Cg (% inibição da Caf:  $54,53 \pm 1,55$ ; Rut:  $60,73 \pm 1,26$ ; AcCl:  $61,48 \pm 1,40$  e Dex:  $55,85 \pm 1,89$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 23).

**Figura 23 - Efeito dos compostos majoritários da *Ilex paraguariensis* sobre a fosforilação da subunidade p65 NF- $\kappa$ B (p-p65 NF- $\kappa$ B)**



Efeito dos compostos majoritários: Caf (5 mg/kg), Rut (1 mg/kg) e AcCl (0,1 mg/kg) administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. Sal: animais tratados com salina estéril (i.pl.); Cg: animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. ##  $P < 0,01$  quando comparado com grupo salina (Sal), \*\* $P < 0,01$ .

## 5. DISCUSSÃO

A *I. paraguariensis* é reconhecidamente possuidora de diversas e importantes ações biológicas. Dentre essas, a ação anti-inflamatória também já foi descrita, tanto em estudos *in vitro*, quanto *in vivo* (PUANGPRAPHANT; DE MEJIA, 2009; SCHINELLA et al., 2014). Entretanto, não existem estudos na literatura disponível referentes à tentativa de utilização desta planta no modelo de inflamação pulmonar induzida por Cg.

A literatura sobre *I. paraguariensis* é vasta no que diz respeito a sua utilização como controladora da obesidade, redutora de colesterol e antioxidante. Já sua ação anti-inflamatória é destacada nos estudos *in vitro*, desta forma, estudos conduzidos *in vivo* ainda merecem destaque. Dentre os poucos trabalhos conduzidos *in vivo*, destacamos o efeito anti-inflamatório da erva-mate administrada a camundongos no modelo de inflamação pulmonar induzida pelo fumo, onde os pesquisadores verificaram sua capacidade em reduzir o estresse oxidativo, o influxo de células inflamatórias para o tecido e a expressão de TNF- $\alpha$  e MMP-9 (LANZETTI et al., 2008). Outra pesquisa relata a ação anti-inflamatória do extrato aquoso da planta sobre as enzimas iNOS e ciclooxigenase 2 (COX-2), quando utilizados os modelos de edema de pata induzida por carragenina e o modelo de edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (SCHINELLA et al., 2014).

Desta maneira, nossa pesquisa é pioneira no que diz respeito ao estudo do efeito do extrato bruto, frações derivadas e compostos majoritários da *I. paraguariensis* sobre a resposta imune humoral no processo inflamatório induzido pela Cg *in vivo*, e também sua ação sobre o principal fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B) nestas mesmas condições. Dessa forma e com estes principais objetivos, nos propusemos a estudar a ação de um extrato bruto padronizado de *I. paraguariensis*, suas frações derivadas, além de seus compostos majoritários caracterizados como forma de estudar a ação anti-inflamatória e imunomoduladora da *I. paraguariensis* em um modelo *in vivo* de inflamação induzida pela Cg.

As folhas de *I. paraguariensis* utilizadas em nossos experimentos foram coletadas no município de Erechim-RS e, a partir delas, foi obtido um extrato bruto hidroalcoólico que apresentou significativas concentrações de compostos fenólicos e xantinas, como ácido clorogênico e cafeína, respectivamente. Tal

característica, também foi verificada em estudos anteriores com a planta que demonstram a presença de compostos fenólicos, saponinas e xantinas como sendo as classes majoritária do perfil fitoquímico da erva-mate (BURRIS et al., 2012; REGINATTO et al., 1999). Um fato importante verificado neste extrato foi a concentração bastante significativa de ácido clorogênico, fato que chamou atenção para a provável ação anti-inflamatória já que este composto é sabidamente possuidor desse efeito (XU; HU; LIU, 2012; ZHANG et al., 2010).

Nos experimentos *in vivo*, a expectativa quanto ao efeito anti-inflamatório se confirmou. Além disso, a *I. paraguariensis* demonstrou interessante efeito imunomodulador no modelo de pleurisia induzida por Cg, o que pode justificar em partes seu efeito anti-inflamatório.

O tratamento prévio dos animais com EB, BuOH, RAq Caf, Rut ou AcCl foi efetivo em inibir a migração leucocitária, principalmente de polimorfonucleares, e também a exsudação na cavidade pleural dos camundongos. Observou-se também a ação inibitória do material vegetal sobre a atividade de enzimas envolvidas na inflamação, sobre o “balanço” entre as concentrações de as citocinas pró e anti-inflamatórias e também sobre os parâmetros histológicos de injúria pulmonar. Além disso, ficou claro que grande parte das ações da *I. paraguariensis* foram decorrentes do efeito inibitório de seus compostos majoritários sobre um importante fator de transcrição nuclear, o NF- $\kappa$ B.

Embora a pleurisia induzida por Cg não seja um modelo de asma propriamente dita, a administração de tal agente flogístico na cavidade pleural dos animais proporciona um ambiente inflamatório agudo, semelhante ao encontrado em pacientes com asma neutrofílica, caracterizado por uma polarização de linfócitos Th1/Th17, notável desequilíbrio entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, alta atividade de enzimas pró-inflamatórias e evidentes alterações histológicas no tecido pulmonar (DALMARCO; FRÖDE, 2007; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015; SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Por possuir um perfil bifásico (4 e 48 h), cuja primeira fase (4 h) é marcada pela massiva infiltração de leucócitos do tipo polimorfonucleares e pelo aumento da exsudação, e a segunda (48 h) caracterizada por um aumento ainda maior da exsudação e da migração leucocitária, com mudança para um perfil mononuclear, esse modelo animal torna-se útil para a triagem de novos compostos, incluindo os

provenientes de produtos naturais, com potencial efeito anti-inflamatório (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

A asma é uma doença crônica e potencialmente séria que afeta cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo. É um relevante problema de saúde global que acomete pessoas de todas as faixas etárias sendo mais prevalente em países em desenvolvimento (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA) 2015, 2015). Além de ser uma doença debilitante quando não controlada e quase sempre associada a outras condições, o manejo da asma demanda altos custos. O estudo desenvolvido por Accordini e colaboradores (2013) retrata que, enquanto o controle da doença diminuiu entre adultos de 11 países europeus, os custos envolvidos na doença aumentaram de maneira dramática, com médias variando entre € 509 por paciente em casos controlados, e € 2281 por paciente com doença não controlada.

A atual abordagem utilizada no manejo da asma, que visa suprimir apenas alguns parâmetros inflamatórios, não tem apresentado resultados altamente satisfatórios, logo, é notável a maior existência de pacientes com asma de difícil controle e que apresentam refratariedade ao tratamento. Desta forma, a busca de compostos que possam de alguma maneira restabelecer o equilíbrio natural do sistema imunológico pode ser de grande valia e apresenta uma grande possibilidade de melhor êxito no tratamento desta condição. Considerando o contexto, um fato que chama a atenção diz respeito aos latino-americanos que consomem maiores quantidades de erva-mate, em forma de bebidas como o chimarrão ou tereré, apresentarem menor prevalência de asma severa quando comparados com pessoas que não usufruem dessas bebidas em grandes quantidades (FORNO et al., 2015).

O efeito da erva-mate sobre a quantidade total de leucócitos na cavidade pleural dos camundongos foi decorrente de sua capacidade inibitória sobre o influxo de polimorfonucleares, bem como sobre a ativação dessas células, visto que o material vegetal testado inibiu significativamente a atividade da MPO, enzima localizada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e liberada para o espaço extracelular como resultado da ativação celular. Ação semelhante da *I. paraguariensis* sobre o conteúdo leucocitário também foi observada nos experimentos realizados por Schinella e colaboradores (2014) que constataram importante redução no influxo de leucócitos devido a inibição de neutrófilos, em modelos

agudo e crônico de edema de orelha induzido por TPA em ratos, e também em modelo agudo de edema de pata induzido por Cg.

De acordo com nossos resultados, outra possível explicação para o fato de o material vegetal de *I. paraguariensis* demonstrar efeito inibitório sobre o influxo de neutrófilos se deve a sua habilidade em reduzir a atividade da ADA. Uma vez inibida a função dessa enzima, o nível de adenosina, substrato de reação da ADA, se mantém podendo exercer seus efeitos anti-inflamatórios. As atuais estratégias terapêuticas no que tange a adenosina e a inflamação das vias aéreas são embasadas no aumento da síntese de adenosina e/ou redução de seu catabolismo, e ainda no antagonismo de receptores do tipo  $A_{2B}$  e/ou ativação de receptores  $A_{2A}$  (DA ROCHA LAPA et al., 2014; POLOSA; BLACKBURN, 2009). Dentre inúmeras funções, a adenosina disponível no ambiente inflamatório age sobre os receptores do tipo  $A_{2A}$  em neutrófilos e resulta em uma menor expressão de moléculas de adesão e inibição da degranulação e atividade antioxidante dessas células (ANTONIOLI et al., 2014; BARLETTA; LEY; MEHRAD, 2012; YAGO et al., 2015). Já a ativação desses receptores em monócitos/macrófagos interfere na inflamação por inibir o processo de fagocitose, diminuir a liberação de EROs e citocinas pró-inflamatórias, além de favorecer a liberação de IL-10 (BLACKBURN et al., 2009). Corroborando com os achados do presente trabalho, o potencial inibitório dos compostos Caf, Rut e AcCl sobre a atividade da ADA foi reportado em um estudo *in vitro* de condições hiperglicêmicas em eritrócitos (DE BONA et al., 2014). Fato interessante é que, embora a Caf seja um antagonista de receptores de adenosina, inclusive  $A_{2A}$  (RIBEIRO; SEBASTIÃO, 2010), tal composto demonstrou efeito inibitório sobre a migração leucocitária. Uma possível explicação para esse fato é a relação desse efeito com outro mecanismo de ação, como a possibilidade de inibição da fosfodiesterase (PDE), uma vez que a Caf é um inibidor não seletivo de PDE (BOSWELL-SMITH; SPINA; PAGE, 2006) capaz de proporcionar o aumento dos níveis de AMPc e, por conseguinte, inibir a adesão de neutrófilos ativados e reduzir sua migração para o sítio inflamatório (BLOEMEN et al., 1997).

Outro sinal primário do processo inflamatório é a formação de exsudato que ocorre devido ao extravasamento plasmático favorecido pela vasodilatação. Diversos mediadores estão implicados nesse processo, sendo os principais a histamina,

prostaglandinas e também o NO (CRECELIUS et al., 2011; EBEIGBE; TALABI, 2014). O aumento das quantidades de NO em condições inflamatórias é consequência da ação da iNOS, principalmente. O NO liberado proporciona vasodilatação com consequente aumento da permeabilidade vascular e, quando produzido em grandes quantidades, torna-se um importante mediador nocivo ao tecido. Esse gás solúvel está intrinsecamente envolvido no desenvolvimento da inflamação pulmonar induzida por Cg. Estudos prévios indicam que a repressão do gene de iNOS acarreta em redução do desenvolvimento da pleurisia devido a uma menor infiltração de polimorfonucleares para a cavidade pleural, menor peroxidação lipídica, bem como menor dano ao tecido (CUZZOCREA et al., 2000).

Corroborando com os resultados obtidos, onde o material vegetal de *I. paraguariensis* testado em camundongos demonstrou efeito inibitório sobre as quantidades de NO<sub>x</sub>, recentemente foi demonstrado por Schinella e colaboradores (2014), em um modelo de edema de pata induzido por Cg, que a erva-mate é capaz de exercer seu efeito anti-inflamatório através da redução da expressão de COX-2 e iNOS, o que acarreta em menor formação de edema. Em relação ao efeito dos compostos majoritários testados, estudos mostram que Caf (KANG et al., 2012a), Rut (ARRUDA-SILVA et al., 2014) e AcCl (HWANG et al., 2014) são capazes de reduzir os níveis de NO nos modelos *in vitro* utilizando células microgliciais BV2 estimuladas por LPS, na pleurisia induzida por Cg em camundongos e *in vitro* com macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, respectivamente. Além disso, sabe-se da ação inibitória de outros compostos presentes na planta, como quercetina e saponinas, sobre as enzimas iNOS e COX-2 (PUANGPRAPHANT; DE MEJIA, 2009).

O desencadeamento e progressão do processo inflamatório é norteador por inúmeros mediadores, tais como: fatores de crescimento, eicosanoides, sistema complemento, peptídeos e, principalmente, pelas citocinas (TURNER et al., 2014). Essas pequenas moléculas sinalizadoras, quando liberadas no ambiente inflamatório, agem através de vias de sinalização intracelular a fim de recrutar e ativar leucócitos, diferencia-los e até mesmo expandi-los em termos de população. O desbalanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias está implicado diretamente no desenvolvimento e progressão de diversas doenças de cunho inflamatório, como artrite reumatoide (WANG et al., 2012), diabetes mellitus tipo 1

(ALNEK et al., 2015), psoríase (COIMBRA et al., 2012), lúpus eritematoso sistêmico (YAP; LAI, 2013) e asma (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

Entre as citocinas inflamatórias, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 exercem papel fundamental no modelo de inflamação pulmonar induzida pela Cg, e também da asma grave humana (AHMAD et al., 2014; CUZZOCREA et al., 1999; DA ROSA et al., 2013; FRÔDE; SOUZA; CALIXTO, 2001; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015). O tratamento prévio dos animais com o extrato bruto, frações derivadas ou compostos majoritários de *I. paraguariensis* causou significativa redução dos níveis dessas citocinas quando comparado ao grupo Cg. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores que demonstraram os efeitos proporcionados pela erva-mate sobre as principais citocinas inflamatórias. Lim e colaboradores (2015) demonstraram que a administração de erva-mate é capaz de diminuir os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-6 em animais submetidos ao modelo de lesão de nervo poupado. Além disso, o estudo desenvolvido por Carmo e colaboradores (2013) mostra que a *I. paraguariensis* é eficaz em reduzir a produção tanto de IL-6 como de TNF- $\alpha$  por células da medula óssea de ratos submetidos à dieta hiperlipídica. O efeito inibitório da erva-mate sobre a concentração do TNF- $\alpha$  também foi demonstrado em estudo utilizando modelo de inflamação pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro (LANZETTI et al., 2008).

No que diz respeito a IL-2 e IL-4, a não detecção dos níveis desses mediadores se faz justificável em nosso modelo, dado que essas citocinas estão direcionadas à resposta do tipo Th2 (LIAO; LIN; LEONARD, 2011; LIAO et al., 2008), enquanto o modelo de pleurisia induzida pela Cg é um modelo exclusivamente neutrofílico de polarização Th1/Th17.

Outro resultado de destaque obtido em nossos experimentos, foi o efeito dessa planta sobre os níveis de IL-17A, citocina relevante neste modelo. O resultado obtido deve ser evidenciado, uma vez que o tipo refratário e severo de asma é caracterizado por uma resposta do tipo Th1/Th17, onde a IL-17A desempenha papel importante na patogenia da doença (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

A ideia benéfica da IL-10 na inflamação pulmonar é sustentada, entre outros estudos, por Cuzzocrea e colaboradores (2002). Em seu estudo retratam que a IL-10 reduz a inflamação



pulmonar induzida pela Cg em camundongos uma vez que é capaz de diminuir a formação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1) e quemocinas e, além disso, sugerem que intervenções que aumentem a geração de IL-10 são úteis no manejo de situações inflamatórias. Tendo isso em vista, outro ponto do presente trabalho a ser evidenciado foi o efeito proporcionado pela *I. paraguariensis* sobre as concentrações de IL-10, principal citocina de caráter anti-inflamatório e imunossupressor que atua na reversão do balanço Th1/Th2/Th17 à níveis basais (CHAUDHRY et al., 2011; RAPHAEL et al., 2014). O que se pode inferir é que tal efeito seja, em grande parte, decorrente da ação do composto majoritário AcCl, uma vez que o mesmo perfil de aumento dessa citocina foi observado para o pré-tratamento com a fração RAq e também com o EB, onde esse composto encontra-se em maiores quantidades. Suportando esse efeito sobre IL-10, o estudo realizado por Pimentel e colaboradores (2013) reporta o aumento da razão IL-10/TNF- $\alpha$  tanto no fígado quanto no músculo de ratos tratados com erva-mate em um modelo de obesidade.

Avaliando os resultados obtidos em relação ao microambiente inflamatório causado pela Cg e as citocinas nele envolvidas, pode-se apontar certa capacidade dos compostos em agir a nível transcricional. Frente a isso, a avaliação da fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B foi realizada e constatou-se o efeito inibitório dos compostos majoritários da *I. paraguariensis* nessa etapa da via de sinalização.

Recordando, o NF- $\kappa$ B é um dos principais fatores de transcrição envolvido na síntese de mediadores e citocinas pró-inflamatórias. O heterodímero mais comum nesses processos é o p65/p50, que uma vez fosforilado, fica livre para desempenhar sua função a nível nuclear e transcrever os genes alvos (BATRA; BALAMAYOORAN; SAHOO, 2011). Os resultados do presente trabalho demonstraram que um dos mecanismos de ação envolvido na ação anti-inflamatória e imunomoduladora dos compostos majoritário de *I. paraguariensis* em camundongos submetidos à pleurisia ocorre a nível transcricional, uma vez que houve inibição na fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B, fato que reduz a migração deste fator ao núcleo para exercer seus efeitos. De maneira semelhante aos nossos achados, são reportados na literatura os efeitos inibitórios sobre a ativação do NF- $\kappa$ B pelos compostos Caf, Rut e AcCl. O efeito da Caf sobre a fosforilação, e consequente translocação, da p65 NF- $\kappa$ B foi reportado por Kang e

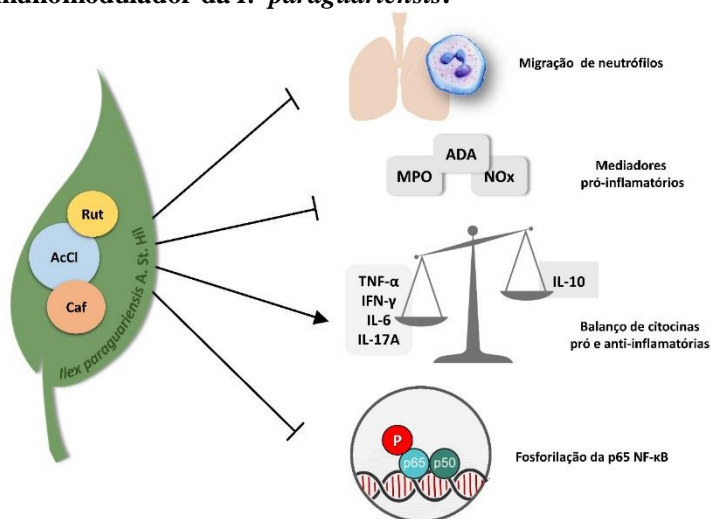
colaboradores (2012a) em um modelo utilizando células microgliciais BV2 estimuladas por LPS. Arruda-Silva e colaboradores (2014), em modelo de pleurisia induzida por Cg em camundongos, relataram que a administração intraperitoneal de Rut culmina em reduzida fosforilação de p65 NF- $\kappa$ B. Por fim, Hwang e colaboradores (2014) reportam que o composto AcCl também exibe seus efeitos na ativação do NF- $\kappa$ B visto que é capaz de atenuar a translocação nuclear de p65 em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.

Finalmente, evidências apontam que o efeito da erva-mate não decorre apenas do seu efeito direto sobre fosforilação da p65 NF- $\kappa$ B, mas também é observado esse efeito como consequência da modulação de outras etapas da via. Por exemplo, o estudo desenvolvido por Fujii e colaboradores (2014) mostra que o consumo do extrato aquoso de erva-mate por ratos submetidos a uma dieta rica em gorduras tem impacto positivo sobre a via do NF- $\kappa$ B não só por reduzir a fosforilação de p65, mas também por diminuir a razão entre o complexo I $\kappa$ B cinase (IKK) fosforilada e total. Somado à isso, Puangpraphant e colaboradores (2013) mostram em seu estudo que o tratamento com chá de erva-mate é capaz de reduzir a expressão de p-I $\kappa$ B- $\alpha$  em ratos.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem concluir que a *I. paraguariensis* possui importante atividade anti-inflamatória no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, um modelo com resposta imune do tipo Th1/Th17. Além disso, foi verificado que este fato ocorre, entre outros fatores, devido sua capacidade de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-6) e de estimular a produção da citocina anti-inflamatória (IL-10) no microambiente inflamatório, proporcionando uma mudança no “desequilíbrio” imune Th1/Th17 provocado pela carragenina, caracterizando seu efeito imunomodulador. Finalmente, o efeito inibitório da redução na produção das citocinas pró-inflamatórias, deve-se pelo menos em parte, a ação dos compostos majoritários da planta sobre a via de sinalização do NF- $\kappa$ B.

**Figura 24 - Resumo gráfico do efeito anti-inflamatório e imunomodulador da *I. paraguariensis*.**



—|: inibe, —>: atua, AcCl: ácido clorogênico, ADA: adenosina desaminase, Caf: cafeína, IFN- $\gamma$ : interferon *gama*, IL-6: interleucina 6, IL-10: interleucina 10, IL-17A: interleucina 17A, MPO: mieloperoxidase, NOx: metabólitos do óxido nítrico, p65 NF- $\kappa$ B: subunidade p65 do fator de transcrição nuclear *kappa* B, Rut: rutina, TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral *alfa*.



## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. **Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System**. 4th. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014.

ACCORDINI, S. et al. The cost of persistent asthma in Europe: an international population-based study in adults. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 160, n. 1, p. 93–101, jan. 2013.

AHMAD, S. F. et al. Role of a histamine 4 receptor as an anti-inflammatory target in carrageenan-induced pleurisy in mice. **Immunology**, v. 142, n. 3, p. 374–83, jul. 2014.

ALNEK, K. et al. Increased Blood Levels of Growth Factors, Proinflammatory Cytokines, and Th17 Cytokines in Patients with Newly Diagnosed Type 1 Diabetes. **PloS One**, v. 10, n. 12, p. e0142976, jan. 2015.

ALVIRA, C. M. Nuclear factor-kappa-B signaling in lung development and disease: one pathway, numerous functions. **Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology**, v. 100, n. 3, p. 202–16, mar. 2014.

AMULIC, B. et al. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 459–489, abr. 2012.

AN, H. et al. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of phenolic acids and flavonoids for the quality control of *Apocynum venetum* L. leaves by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS and HPLC-DAD. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 85, p. 295–304, nov. 2013.

ANTONIOLI, L. et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 6, p. 842–62, jun. 2012.

ANTONIOLI, L. et al. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 8, p. 1051–68, 2014.

ARÇARI, D. P. et al. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 17, n. 12, p. 2127–33, dez. 2009.

ARÇARI, D. P. et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 2, p. 110–5, mar. 2011.

ARRUDA-SILVA, F. et al. *Polygala molluginifolia* A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. **International Immunopharmacology**, v. 19, n. 2, p. 334–41, abr. 2014.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, n. 1, p. 385–406, dez. 2012.

BARLETTA, K. E.; LEY, K.; MEHRAD, B. Regulation of Neutrophil Function by Adenosine. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 4, p. 856–64, jun. 2012.

BASTOS, D. H. M. et al. Yerba maté: pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 37–46, 2007.

BATRA, S.; BALAMAYOORAN, G.; SAHOO, M. K. Nuclear factor- $\kappa$ B: a key regulator in health and disease of lungs. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 59, n. 5, p. 335–51, out. 2011.

BAUER, A.; BRÖNSTRUP, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 1, p. 35–60, jan. 2014.

BHATTACHARYYA, S. et al. Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NF $\kappa$ B-interleukin-8 inflammatory

pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 16, p. 10550–8, abr. 2008.

BHATTACHARYYA, S.; DUDEJA, P. K.; TOBACMAN, J. K. Carrageenan-induced NF $\kappa$ B activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 7-8, p. 973–82, jan. 2008.

BLACKBURN, M. R. et al. Adenosine receptors and inflammation. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 193, p. 215–69, jan. 2009.

BLOEMEN, P. G. et al. Increased cAMP levels in stimulated neutrophils inhibit their adhesion to human bronchial epithelial cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 272, n. 4, p. L580–587, abr. 1997.

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

BOSWELL-SMITH, V.; SPINA, D.; PAGE, C. P. Phosphodiesterase inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v. 147 Suppl, p. S252–7, jan. 2006.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–84, jul. 2011.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206–209, mar. 1982.

BRAVO, L. et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. **Fitoterapia**, v. 92, p. 219–29, jan. 2014.

BURRIS, K. P. et al. Composition and Bioactive Properties of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): A Review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 2, p. 268–275, 2012.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 11, p. 1612–61, nov. 2014.

CALABRESE, L. H.; ROSE-JOHN, S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 10, n. 12, p. 720–7, dez. 2014.

CARMO, L. S. et al. The Effects of Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis*) Consumption on IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 Production by Bone Marrow Cells in Wistar Rats fed a High-Fat Diet. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, nov. 2013.

CHAUDHRY, A. et al. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. **Immunity**, v. 34, n. 4, p. 566–78, abr. 2011.

CHESNÉ, J. et al. IL-17 in severe asthma. Where do we stand? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 190, n. 10, p. 1094–101, nov. 2014.

COIMBRA, S. et al. The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 4, p. 389–95; quiz 395–8, abr. 2012.

COMMINS, S. P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S53–72, fev. 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–95, jun. 2013.

CRECELIUS, A. R. et al. Mechanisms of ATP-mediated vasodilation in humans: modest role for nitric oxide and vasodilating prostaglandins. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 4, p. H1302–H1310, out. 2011.



CUÉNOUD, P. Molecular Phylogeny and Biogeography of the Genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae). **Annals of Botany**, v. 85, n. 1, p. 111–122, jan. 2000.

CUZZOCREA, S. et al. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 9, p. 5094–104, nov. 1999.

CUZZOCREA, S. et al. Inducible Nitric Oxide Synthase—Knockout Mice Exhibit Resistance to Pleurisy and Lung Injury Caused by Carrageenan. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, n. 5, p. 1859–1866, 14 nov. 2000.

CUZZOCREA, S. et al. Absence of endogenous interleukin-10 enhances the evolution of acute lung injury. **European Cytokine Network**, v. 13, n. 3, p. 285–97, jan. 2002.

DA ROCHA LAPA, F. et al. Pharmacology of Adenosine Receptors and Their Signaling Role in Immunity and Inflammation. In: GOWDER, S. J. T. (Ed.). **Pharmacology and Therapeutics**. [s.l.] InTech, 2014. p. 83–128.

DA ROSA, J. S. et al. Systemic administration of *Rosmarinus officinalis* attenuates the inflammatory response induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Planta Medica**, v. 79, n. 17, p. 1605–14, nov. 2013.

DALMARCO, E. M.; FRÖDE, T. S. Methotrexate inhibits integrin adhesion molecules in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 5, p. 777–84, set. 2007.

DARTORA, N. et al. UPLC-PDA–MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1453–61, dez. 2011.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299–315, jun. 2014.

DAVIES, M. J. et al. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 7, p. 1199–234, jul. 2008.

DE BONA, K. S. et al. Syzygium cumini is more effective in preventing the increase of erythrocytic ADA activity than phenolic compounds under hyperglycemic conditions in vitro. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 321–30, jun. 2014.

DE NARDO, D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, v. 74, n. 2, p. 181–9, abr. 2015.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. S1, p. S34–S45, nov. 2007.

DOLFF, S. et al. Disturbed Th1, Th2, Th17 and T(reg) balance in patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical Immunology**, v. 141, n. 2, p. 197–204, nov. 2011.

EBEIGBE, A.; TALABI, O. Review: Vascular Effects of Histamine. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 7–10, 2014.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. Suppl 1, p. 69–75, mar. 2001.

FERREIRA, T. S. et al. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 290–8, jun. 2014.

FORNO, E. et al. Asthma in Latin America. **Thorax**, v. 70, n. 9, p. 898–905, set. 2015.

FRÖDE, 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, fev. 2001.

FUJII, T. M. DE M. et al. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) modulates NF-kappaB pathway and AKT expression in the liver of rats fed on a high-fat diet. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 65, n. 8, p. 967–76, dez. 2014.

GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The positive effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) in obesity. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 730–50, jan. 2015.

GEA-BANACLOCHE, J. C. Immunomodulation. In: **Principles of Molecular Medicine**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 893–904.

GHOSH, S.; ERZURUM, S. C. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 11, p. 1008–16, nov. 2011.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Adenosine deaminase: colorimetric method. In: HU BERGMAYER (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. Weinheim, Germany: [s.n.]. p. 315–323, 1984.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA) 2015. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention**. Disponível em: <[http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA\\_Report\\_2015\\_Aug11.pdf](http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2015_Aug11.pdf)>. Acesso em: 26 jan. 2016.

GOTTLIEB, A. M.; GIBERTI, G. C.; POGGIO, L. Molecular analyses of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in southern South America, evidence from AFLP and ITS sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 352–69, fev. 2005.

GRANICA, S. et al. Qualitative and quantitative analyses of secondary metabolites in aerial and subaerial of *Scorzonera hispanica* L. (black salsify). **Food Chemistry**, v. 173, p. 321–31, abr. 2015.

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

GROPPO, M. **Ilex paraguariensis A.St.-Hil.** Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4904>>>. Acesso em: 4 nov. 2015.

GU, C.; WU, L.; LI, X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. **Cytokine**, v. 64, n. 2, p. 477–85, nov. 2013.

HASKÓ, G. et al. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 7, n. 9, p. 759–70, set. 2008.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138–51, nov. 2007.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 86, p. 1–15, jan. 2013.

HWANG, S. J. et al. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Inflammation Research**, v. 63, n. 1, p. 81–90, jan. 2014.

ISAILOVIC, N. et al. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. **Journal of Autoimmunity**, v. 60, p. 1–11, maio 2015.

IWAMOTO, H. et al. Differences in plasma and sputum biomarkers between COPD and COPD-asthma overlap. **The European Respiratory Journal**, v. 43, n. 2, p. 421–9, fev. 2014.

JAILLON, S. et al. Neutrophils in innate and adaptive immunity. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, n. 4, p. 377–94, jul. 2013.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p. 201–12, mar. 2011.

KANG, C.-H. et al. Caffeine suppresses lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells by suppressing Akt-mediated NF- $\kappa$ B activation and ERK phosphorylation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4270–6, dez. 2012a.

KANG, Y.-R. et al. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate ( *Ilex paraguariensis* ) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Laboratory Animal Research**, v. 28, n. 1, p. 23, mar. 2012b.

KARMOUTY-QUINTANA, H.; XIA, Y.; BLACKBURN, M. R. Adenosine signaling during acute and chronic disease states. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, n. 2, p. 173–81, fev. 2013.

KASHANI, H. H. et al. Pharmacological properties of medicinal herbs by focus on secondary metabolites. **Life Science Journal**, v. 9, n. 1, p. 509–20, 2012.

KAY, A. Immunomodulation in asthma: mechanisms and possible pitfalls. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 220–26, jun. 2003.

KHODADADI, I. Mini Review From the Molecular Base to the Diagnostic Value of Adenosine Deaminase. **Avicenna Journal of Medical Biochemistry**, v. 2, n. 2, p. e24310, nov. 2014.

KLEBANOFF, S. J. et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 2, p. 185–98, mar. 2013.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–75, mar. 2013.

KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S. G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. **Immunology**, v. 113, n. 4, p. 427–37, dez. 2004.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The immunology of asthma. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 45–56, 2015.

LANZETTI, M. et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 375–81, abr. 2008.

LI, M.-N. et al. Global identification and quantitative analysis of chemical constituents in traditional Chinese medicinal formula Qi-Fu-Yin by ultra-high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 114, p. 376–89, out. 2015.

LIAO, W. et al. Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. **Nature Immunology**, v. 9, n. 11, p. 1288–96, nov. 2008.

LIAO, W.; LIN, J.-X.; LEONARD, W. J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 5, p. 598–604, out. 2011.

LIM, D. W. et al. Analgesic Effect of *Ilex paraguariensis* Extract on Postoperative and Neuropathic Pain in Rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 10, p. 1573–9, 2015.

LINA, C. et al. Combined treatment of etanercept and MTX reverses Th1/Th2, Th17/Treg imbalance in patients with rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 31, n. 4, p. 596–605, ago. 2011.

LIU, M.-W. et al. Effect of salidroside on lung injury by upregulating peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression in septic rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 7, n. 6, p. 1446–56, jun. 2014.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

LUZINA, I. G. et al. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 4, p. 753–64, out. 2012.

MANEN, J.-F. et al. The history of extant *Ilex* species (Aquifoliaceae): evidence of hybridization within a Miocene radiation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, n. 3, p. 961–77, dez. 2010.

MANIATI, E.; SOPER, R.; HAGEMANN, T. Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. **Oncogene**, v. 29, n. 42, p. 5653–62, out. 2010.

MANNINO, M. H. et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Letters**, v. 367, n. 2, p. 103–7, out. 2015.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–6, mar. 2010.

MIHARA, M. et al. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, v. 122, n. 4, p. 143–59, fev. 2012.

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

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769–807, out. 2011.

MORA, C. et al. How many species are there on Earth and in the ocean? **PLoS Biology**, v. 9, n. 8, p. e1001127, ago. 2011.

MULLANE, K.; WILLIAMS, M. Animal models of asthma: reprise or reboot? **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 131–9, jan. 2014.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, p. 1–19, mar. 2012.

NOACK, M.; MIOSSEC, P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 6, p. 668–77, jun. 2014.

NUSSBAUM, C. et al. Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 692–713, mar. 2013.

PIMENTEL, G. D. et al. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 5, p. 809–18, maio 2013.

POLOSA, R.; BLACKBURN, M. R. Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 10, p. 528–35, out. 2009.

PRADO MARTIN, J. G. et al. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 45, n. 2, p. 93–8, jan. 2013.

PROKOPOWICZ, Z. et al. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 60, n. 1, p. 43–54, fev. 2012.

PUANGPRAPHANT, S. et al. Yerba mate tea and mate saponins prevented azoxymethane-induced inflammation of rat colon through suppression of NF- $\kappa$ B p65ser(311) signaling via I $\kappa$ B- $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  reduced phosphorylation. **BioFactors**, v. 39, n. 4, p. 430–40, 2013.

PUANGPRAPHANT, S.; DE MEJIA, E. G. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NF $\kappa$ B pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8873–83, out. 2009.

QUAGLINO, P. et al. Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell pattern in psoriatic patients: modulation of cytokines and gene targets induced by etanercept treatment and correlation with clinical response. **Dermatology**, v. 223, n. 1, p. 57–67, jan. 2011.

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, dez. 1993.



RAPHAEL, I. et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 5–17, out. 2014.

REGINATTO, F. H. et al. Methylxanthines accumulation in Ilex species - caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other Ilex species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 443–6, dez. 1999.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M. Caffeine and adenosine. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20 Suppl 1, p. S3–15, jan. 2010.

RICCIARDOLO, F. L. M. et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 3, p. 731–65, jul. 2004.

RINCON, M.; IRVIN, C. G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 9, p. 1281–90, jan. 2012.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10A, p. 43D–49D, maio 2008.

ROCHA LAPA, F. DA et al. Anti-inflammatory effects of purine nucleosides, adenosine and inosine, in a mouse model of pleurisy: evidence for the role of adenosine A2 receptors. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 4, p. 693–704, dez. 2012.

ROCHA LAPA, F. DA et al. Anti-inflammatory effects of inosine in allergic lung inflammation in mice: evidence for the participation of adenosine A2A and A3 receptors. **Purinergic Signalling**, v. 9, n. 3, p. 325–36, set. 2013.

SABIO, G.; DAVIS, R. J. TNF and MAP kinase signalling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 3, p. 237–45, 16 jun. 2014.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 10, p. 452–60, out. 2011.

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

SANTOS, E. C. S. et al. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, v. 292, p. 13–21, fev. 2015.

SCHINELLA, G. et al. An aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation. **Planta Medica**, v. 80, n. 12, p. 961–8, ago. 2014.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 93–131, jan. 2006.

SCHMIDT, B. et al. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism**, v. 57, p. S3–S9, jul. 2008.

SEDGER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 453–72, ago. 2014.

SHABGAH, A. G.; FATTAHI, E.; SHAHNEH, F. Z. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. **Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 31, n. 4, p. 256–61, ago. 2014.

SHADIA, K. Adenosine Deaminase Assay in Different Body Fluids for the Diagnosis of Tubercular Infection. **American Journal of Biomedical and Life Sciences**, v. 3, n. 3, p. 49–54, 2015.

SHI, Y. et al. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma. **Chinese medical journal**, v. 124, n. 13, p. 1951–6, jul. 2011.

SILVA, F. A. E. **Estudo do efeito anti-inflamatório da *Polygala molluginifolia* St.-Hil. & Moq no modelo da pleurisia induzida**

**pela carragenina em camundongos.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 4, p. 1167–72, jan. 2015.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–20, mar. 2010.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, p. a016295, out. 2014.

TECCHIO, C.; MICHELETTI, A.; CASSATELLA, M. A. Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 508, out. 2014.

TEDGUI, A. Focus on inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 958–9, maio 2011.

TOBLER, A.; KOEFFLER, H. P. Myeloperoxidase: Localization, Structure, and Function. In: HARRIS, J. R. (Ed.). **Blood Cell Biochemistry**. Blood Cell Biochemistry. 3. ed. Boston, MA: Springer US, 1991. v. 3p. 255–88.

TOUSOULIS, D. et al. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. **Current Vascular Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 4–18, jan. 2012.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, n. 11, p. 2563–82, nov. 2014.

WALSH, K. P.; MILLS, K. H. G. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 11, p. 521–30, nov. 2013.

WANG, J.; ARASE, H. Regulation of immune responses by neutrophils. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1319, p. 66–81, jun. 2014.

WANG, W. et al. The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v. 32, n. 4, p. 887–93, abr. 2012.

WEBB, D. R. Animal models of human disease: inflammation. **Biochemical pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 121–30, jan. 2014.

WHO. **World Health Organization traditional medicine strategy: 2014-2023**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf?ua=1)>. Acesso em: 16 abr. 2015.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 642–60, fev. 2013.

XU, J.-G.; HU, Q.-P.; LIU, Y. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 46, p. 11625–30, nov. 2012.

YAGO, T. et al. Multi-Inhibitory Effects of A2A Adenosine Receptor Signaling on Neutrophil Adhesion Under Flow. **Journal of Immunology**, v. 195, n. 8, p. 3880–9, out. 2015.

YAP, D. Y. H.; LAI, K. N. The role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus - from bench to bedside. **Nephrology**, v. 18, n. 4, p. 243–55, abr. 2013.

ZHANG, X. et al. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Injury**, v. 41, n. 7, p. 746–52, jul. 2010.

ZHOU, Y. et al. Alterations in adenosine metabolism and signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9224, jan. 2010.

## APÊNDICE A – TRABALHOS DESENVOLVIDOS

### Artigo submetido



Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">edit</a>	<a href="#">1181</a>	The anti-inflammatory effect of <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil (Mate) occurs through immunomodulation in a murine model of IIR9 inflammation	Feb 01, 2016	Feb 01, 2016	Submitted to Journal

### Resumos apresentados em anais de congressos

**LUZ, A. B. G.**; BARATTO, B. ; NASCIMENTO, M. V. P. S. ; FACCHIN, B. M. C. ; SILVA, C. H. B. ; REGINATTO, F. H. ; Fröde, TS ; DALMARCO, E. M. . Efeito anti-inflamatório da *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil e compostos majoritários no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.. 2015. In: XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2015, São Paulo-SP. XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2015.

**LUZ, A. B. G.**. Estudo do efeito e do mecanismo de ação anti-inflamatório da *Polygala molluginifolia* A. St. Hil. & Moq no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. In: 24ª Semana de Iniciação científica da UFSC, 2014, Florianópolis.

**LUZ, A. B. G.**; BARATTO, B. ; NASCIMENTO, M. V. P. S. ; DALMARCO, E. M. . 7-Prenyloxi-6-methoxycoumarin, the major compound of *Polygala sabulosa* A. W. Bennett, inhibits NF-kB 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.



## ANEXO A– TRABALHOS EM PARCERIA

### Resumos em parceria apresentados em anais de congressos

MUNHOZ, A. C. M. ; NASCIMENTO, MARCUS VINICIUS P.S. ; **LUZ, A. B. G.** ; DALMARCO, E. M. ; FRÖDE, TS . Atividade anti-inflamatória da escopoletina, composto isolado da *Polygala sabulosa* A.W.Benett.. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2015, São Paulo. XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2015.

NASCIMENTO, M. V. P. S. ; **LUZ, A. B. G.** ; MUNHOZ, A. C. M. ; FRÖDE, TS ; DALMARCO, E. M. . Atividade inibitória da escopoletina, composto isolado da *Polygala sabulosa* A.W.Benett, sobre citocinas pró-inflamatórias e sobre a fosforilação do NF-kB e p38 MAPK.. In: XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2015, São Paulo. XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2015.

FRÖDE, TS ; VIGIL, S. V. G ; FACCHIN, B. M. C. ; **LUZ, A. B. G.** ; BOSI, C. F. ; ROSA, D. W. ; BIAVATTI, M. W. . Evidence of the anti-inflammatory properties of *Ageratum conyzoides* L. in a murine model of pleurisy induced by carrageenan.. In: 2014 AACC Annual Meeting & Clinical Lab Expo, 2014, Atlanta. 2014 Abstract of the Scientific Posters from AACC Annual Meeting, 2014. v. 60. p. S1-S282.

### Artigos em parceria publicados:

DOS SANTOS NASCIMENTO, MARCUS ; ARRUDA-SILVA, FÁBIO ; **LUZ, ANA** ; VENZKE, DALILA ; QUEIROZ, GUSTAVO ; MENDES, BEATRIZ ; FERNANDES-RIBEIRO, EDUARDO ; FRÖDE, TÂNIA ; PIZZOLATTI, MOACIR ; DALMARCO, EDUARDO . 7-prenyloxi-6-methoxycoumarin from *Polygala sabulosa* A.W. Bennett Regulates p38 MAPK and NF-kB Pathways Inhibiting the Inflammation Induced by Carrageenan in the Mouse Model of Pleurisy. *Inflammation & Allergy. Drug Targets*, v. 14, p. 37-46, 2015.

ARRUDA-SILVA, FÁBIO ; NASCIMENTO, MARCUS VINICIUS P.S. ; LUZ, ANA B.G. ; VENZKE, DALILA ; QUEIROZ, GUSTAVO S. ; FRÖDE, TÂNIA S. ; PIZZOLATTI, MOACIR G. ; DALMARCO, EDUARDO M. . *Polygala molluginifolia* A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. *International Immunopharmacology (Print)*, v. 19, p. 334-341, 2014.