

Fábio Arruda e Silva

ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *Polygala molluginifolia* ST.-HIL. & MOQ NO MODELO DE PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco

Florianópolis

2014

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

Arruda-Silva, Fábio

Estudo do efeito anti-inflamatório da *Poligala molluginifolia* St.-Hil. & Moq no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos / Fábio Arruda-Silva ; orientador, Eduardo Monguilhott Dalmarco - Florianópolis, SC, 2014.

109 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Polylaga molluginifolia*. 3. Pleurisia. 4. Efeito anti-inflamatório. 5. Camundongos. I. Dalmarco, Eduardo Monguilhott. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Folha da defesa

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e determinação.

Aos meus pais Giseli Arruda e Silva e Lourival Pereira e Silva por sempre terem acreditado, apoiado e incentivado o caminho que escolhi seguir;

Ao meu orientador, Eduardo Molguilhott Dalmarco, pela confiança depositada em mim e principalmente pela oportunidade concedida para realizar esse trabalho. Pelo aprendizado, atenção, amizade e também pelos momentos de descontração;

Ao meu amigo Marcus V. P. S. Nascimento, pelo auxílio nos experimentos durante seu período de voluntário no laboratório e pela grande amizade;

A Ana Beatriz G. Luz, pelo auxílio nos experimentos durante sua iniciação científica;

Ao Rafael de liz, pelo companherismo e conhecimento compartilhado no laboratório e nos congressos, e também pelos experimentos feitos no exterior;

Aos demais colegas de laboratório, Gustavo e Júlia, que me ensinaram as primeiras técnicas, ao Rodrigo, Renata, Bruno, Silvana, Geison pelos momentos de descontração e a Marina Nader, pelo companherismo na realização dos experimentos e nos congressos;

A professora Tânia Silvia Fröde, pelo conhecimento e experiência compartilhada, e por ceder o seu laboratório para a realização desse trabalho;

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

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

A professora Michele e ao Rodrigo, da FURB, pela parceria e amizade;

A professora Alessandra Beirith, por ter despertado o meu interesse pela pesquisa e pela carreira acadêmica;

A professora Tânia C. Pasa pelo apoio e por disponibilizar os equipamentos de seu laboratório;

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

Aos funcionários do LAMEB I, pelo auxílio com os experimentos de qPCR;

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

RESUMO

A *Polygala molluginifolia* é uma planta nativa do sul do Brasil popularmente chamada de cânfora. Plantas do gênero *Polygala* têm sido usadas na medicina tradicional para o tratamento de diferentes patologias, inclusive doenças inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos obtidos da espécie *Polygala molluginifolia* (*Polygalaceae*) no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. O material vegetal da *Polygala molluginifolia* foi submetido a extração por maceração com etanol 96% para a obtenção do extrato bruto (EB). O EB foi submetido a procedimentos cromatográficos em sílica gel para a obtenção de diferentes frações, dentre elas as frações aquosa (Aq), acetato de etila (AcOEt) e hexano (Hex). O composto 1 (5,3',4'-trihidroxi-6'',6''-dimetilpirano [2'',3'';7,6] isoflavona) (Iso), foi isolado da fração AcOEt e o composto 2 (Rutina) (Rut), foi isolado da fração Aq e foram identificados por meio de espectroscopia de ^1H e ^{13}C NMR e quantificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). A avaliação do efeito anti-inflamatório foi realizada por meio da contagem de leucócitos, neutrófilos e concentrações de exsudato. Foram utilizadas técnicas padronizadas descritas na literatura para verificar a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-desaminase (ADA) e concentrações de nitrito/nitrato (NO_x). Neste estudo também foi investigado o efeito da *Polygala molluginifolia* sobre a concentração e expressão do RNA mensageiro das citocinas fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$), utilizando as metodologias de enzima imunoensaio (ELISA) e a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) e sobre a via de sinalização do fator nuclear κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), mais especificamente sobre a fosforilação da subunidade p65. Os parâmetros inflamatórios foram avaliados 4 horas após a indução da pleurisia. Para todos os experimentos, a dexametasona (Dex, 0,5 mg/kg, i.p.) foi utilizada como fármaco de referência anti-inflamatória. A análise estatística utilizada foi o teste de variância ANOVA, complementado pelo teste de Neuman-Keuls, e quando necessário, foram realizados teste t de Student e correlação de Pearson. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. O EB, as as frações Aq, AcOEt e Hex, além dos compostos Iso e Rutina, foram capazes de reduzir a migração de leucócitos, as custas de neutrófilos e a exsudação formada na cavidade pleural ($p < 0,05$), além das atividades de: MPO ($p < 0,01$), ADA ($p < 0,001$). As concentrações de NO_x também foram inibidas ($p < 0,001$), exceto quando os animais foram tratados com a rutina. Além disso, houve redução na concentração da $\text{TNF-}\alpha$ ($p < 0,01$) e $\text{IL-1}\beta$ ($p < 0,001$). Os compostos isolados

(Iso e Rutina) foram capazes de inibir a transcrição do RNAm do TNF- α ($p < 0,01$) e IL-1 β ($p < 0,001$) além de reduzir significamente a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B ($p < 0,001$). Finalmente, foi verificada uma correlação positiva entre a inibição na migração celular e exsudação com a capacidade de ambos compostos em reduzir a fosforilação da p65. Os resultados demonstraram que a *P. molluginifolia* tem importante ação anti-inflamatória e este efeito é devido, pelo menos em parte, a presença de Iso e Rutina. Além disso, esse efeito parece estar relacionado a capacidade dos compostos isolados interferirem na via de sinalização do NF- κ B.

Palavras Chaves: *Polylaga molluginifolia*, pleurisia, efeito anti-inflamatório, camundongos.

ABSTRACT

The *Polygala molluginifolia* is a plant native to southern Brazil that is popularly called "canfora". This study was conducted to investigate the anti-inflammatory activity of *Polygala molluginifolia* (*Polygalaceae*) on the mouse pleurisy model induced by carrageenan. The whole *Polygala molluginifolia* plant material was extracted by maceration with 96% ethanol. The crude hydroalcoholic extract (CE) was subjected to chromatographic procedures to produce derivate fractions, including aqueous (Aq), ethyl acetate (AcOEt), and hexane (Hex) fractions. Compound 1 (5,3',4'-trihydroxy-6'',6''-dimethylpyrano [2'',3'':7,6] isoflavone) (Iso), which was isolated from the AcOEt fraction, and Compound 2 (Rutin) (Rut), which was isolated from the Aq fraction, were identified using ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy and quantified using an HPLC apparatus. In this experimental protocol, swiss mice were used in the murine carrageenan-induced pleurisy model previously described by Saleh *et al.* (1996). The anti-inflammatory effect was evaluated by total leukocyte and neutrophil count, exsudate concentration, myeloperoxidase (MPO) and adenosine-deaminase (ADA) activities, nitrite/nitrate concentrations (NO_x), concentrations and mRNA expression of tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF-}\alpha$) and interleukin 1-beta (IL-1). In addition, we studied the effect of *Polygala molluginifolia* isolated compounds on the nuclear factor κ B (NF- κ B). The inflammatory parameters were evaluated 4 hours after pleurisy induction. Dexamethasone (Dex, 0,5 mg/kg, i.p.) was used as reference anti-inflammatory drug. For statistical analysis were used the variance test (ANOVA), complemented by Newman-Keuls and when required, Student's *t* test and Pearson's coefficient. $p < 0.05$ was considered significant. The CE, Aq, AcOEt, and Hex fractions, and the isolated compounds Iso and Rut were able to reduce cell migration and exudation ($p < 0.05$). Furthermore, the plant material also decreased the MPO ($p < 0.01$) and ADA ($p < 0.001$) activities and the nitric oxide (NO_x) ($p < 0.001$), $\text{TNF-}\alpha$ ($p < 0.001$), and $\text{IL-1}\beta$ ($p < 0.001$) levels. In addition, Iso and Rut reduced the $\text{TNF-}\alpha$ ($p < 0.01$) and $\text{IL-1}\beta$ ($p < 0.001$) mRNA expression levels and significantly decreased NF- κ B p65 phosphorylation ($p < 0.001$). Finally, was observed a positive correlation on leukocyte migration and exudate levels with inhibition upon p65 phosphorylation. The results show that *P. molluginifolia* has a significant anti-inflammatory action and that this effect is due, at least in part, to the presence of Iso and Rut in large amounts. Moreover, this effect was found to be closely related to the inhibitory effects of the isolated compounds on the NF- κ B pathway.

Keywords: *Polygala molluginifolia*, pleurisy, anti-inflammatory action, mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Polygala molluginifolia</i>	27
Figura 2. Formação de EROs pela MPO.....	31
Figura 3. Ativação dos receptores de adenosina	32
Figura 4. Via de ativação canônica do NF-kappaB	36
Figura 5. Fluxograma do processo de extração e isolamento dos compostos.	40
Figura 6. Estrutura química do composto 1 (A) e do composto 2 (B)	41
Figura 7. Cromatograma do Extrato Bruto (EB).....	53
Figura 8. Cromatograma do composto 1 (Iso).	54
Figura 9. Cromatograma da rutina.	54
Figura 10. Efeito do extrato bruto da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).....	56
Figura 11. Efeito da fração aquosa (Aq) da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).....	57
Figura 12. Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).....	58
Figura 13. Efeito da fração hexano (Hex) da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).....	59
Figura 14. Efeito do composto 1 (Iso) da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).....	61
Figura 15. Efeito do composto 2 (Rutina) da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).....	62
Figura 16. Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre a atividade da enzima mieloperoxidase	63
Figura 17. Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre a atividade da enzima adenosina desaminase	64
Figura 18. Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre a concentração de nitrito/nitrato	65
Figura 19. Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre a concentração de TNF- α	66
Figura 20. Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre a concentração de IL-1 β	67
Figura 21. Efeito dos compostos isolados da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre a expressão de RNAm do TNF- α e IL-1 β	69
Figura 22. Efeito dos compostos isolados (Iso e Rut) da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B.	71
Figura 23. Resumo gráfico dos efeitos da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre os mediadores pró-inflamatórios analisados.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A ₁ R	Receptor de adenosina 1
A _{2A} R	Receptor de adenosina 2A
A _{2B} R	Receptor de adenosina 2B
A ₃ R	Receptor de adenosina 3
ADA	Adenosina deaminase
Balb/c	Linhagem de camundongos Balb/c
Bcl-10	<i>B-cell leukemia/lymphoma</i> 10
BV2	Células de microglia tipo BV-2
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Cg	Carragenina
DEPC	Dietilpirocarbonato
Dex	Dexametasona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Enzima desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ELISA	Enzimaimunoensaio
ERNs	Espécies reativas do nitrogênio
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FDA	<i>Food and drug administration</i>
fMLP	n-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Hsp-27	<i>Heat-shock protein</i> 27
IKK	Proteína inibitória <i>kappa</i> B cinase
IKK α	Proteína inibitória <i>kappa</i> B cinase alfa
IKK β	Proteína inibitória <i>kappa</i> B cinase beta
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-1R	Receptor para interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-17A	Interleucina 17A
INF- γ	Interferon gama
I κ B α	Subunidade inibitória do fator de transcrição nuclear NF- κ B
i.v.	Administrado por via intravenosa

Iso	5,3',4'-trihidroxi-6'',6''-dimetilpirano [2'',3'':7,6] isoflavona
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MMP9	Metaloproteinase de matriz 9
MNs	Mononucleares
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NAPDH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NEMO	NF-κB <i>essencial modulator</i>
NIK	Proteína indutora do NF-κB
NF-κB	Fator de transcrição nuclear <i>kappa B</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS1	Óxido nítrico sintase constitutiva neuronal
NOS2	Óxido nítrico sintase induzida
NOS3	Óxido nítrico sintase constitutiva endotelial
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO _x	Nitrito/Nitrato
OVA	Ovalbumina
p50	Subunidade (p50) do fator de transcrição nuclear NF-κB
p65	Subunidade (p65) do fator de transcrição nuclear NF-κB
PBS	Tampão fosfato/salina
PGE ₂	Prostaglandina E2
PMA	Acetato de forbol miristato
PMNs	Polimorfonucleares
qPCR	Reação da cadeia polimerase em tempo real
QSAR	<i>Quantitative Structure-activity relationship</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _{se}	Enzima que degrada o RNA
RPM	Rotações por minuto
Rut	Rutina
SOD	Superóxido dismutase
Taq DNA polimerase	Enzima que amplifica fragmentos de DNA

TGF- β	Fator transformante de colônias beta
Th17	Linhagem de células T <i>helper</i> 17
TLR4	Receptor <i>Toll-like</i> 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR	Receptor para TNF

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
3.1	PLANTAS MEDICINAIS	25
3.2	GÊNERO <i>POLYGALA</i>	26
3.3	PROCESSO INFLAMATÓRIO	27
3.3.1	Neutrófilos	28
3.3.2	Mononucleares	29
3.3.3	Mieloperoxidase.....	30
3.3.4	Adenosina-desaminase.....	31
3.3.5	Óxido nítrico	32
3.4	CITOCINAS PRO-INFLAMATÓRIAS	33
3.5	FATORES DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR	34
3.5.1	Fator de transcrição nuclear <i>kappa</i> -B (NF- κ B).....	34
3.6	MODELOS DE INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	39
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS	39
4.2.1	Preparação do extrato Bruto.....	39
4.2.2	Extração líquido-líquido.....	39
4.2.3	Isolamento e purificação dos compostos.....	39
4.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DO EXTRATO BRUTO (CLAE-UV).....	41
4.4	ANIMAIS	42

4.5	PROCEDIMENTO ANESTÉSICO	42
4.6	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	42
4.7	PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA	43
4.8	CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS	44
4.8.1	Coloração dos esfregaços celulares.....	44
4.9	DETERMINAÇÃO DA EXUDAÇÃO.....	45
4.10	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE	45
4.11	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE.....	45
4.12	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÓXIDO NÍTRICO	46
4.13	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS PRÓ- INFLAMATÓRIAS (TNF- α e IL-1 β)	47
4.14	DETERMINAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DO MRNA PARA AS CITOCINAS PRÓ- INFLAMATÓRIAS: TNF- α E IL-1 β	47
4.14.1	Extração e quantificação do RNA.....	47
4.14.2	Reação da transcrição reversa (RT)	48
4.14.3	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	48
4.15	DETERMINAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA P65 (NF- κ B)	49
4.15.1	Dosagem de proteínas totais	49
4.15.2	Quantificação da proteína p65 fosforilada	50
4.16	FÁRMACOS E REAGENTES.....	50
4.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5	RESULTADOS	53
5.1	ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	53
5.2	EFEITO DA <i>POLYGALA MOLLUGINIFOLIA</i> SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXUDAÇÃO	55
5.3	EFEITO DA <i>POLYGALA MOLLUGINIFOLIA</i> SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE.....	63

5.4	EFEITO DA <i>POLYGALA MOLLUGINIFOLIA</i> SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE.....	64
5.5	EFEITO DA <i>POLYGALA MOLLUGINIFOLIA</i> SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO E NITRITO	65
5.6	EFEITO DA <i>POLYGALA MOLLUGINIFOLIA</i> SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA	66
5.7	EFEITO DOS DA <i>POLYGALA MOLLUGINIFOLIA</i> SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE INTERLEUCINA-1 BETA	67
5.8	EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>POLYGALA MOLLUGINIFOLIA</i> SOBRE A EXPRESSÃO DE RNAM DO TNF- α E IL-1 β	68
5.9	EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS SOBRE A PROTEINA P65 FOSFORILADA (NF-KB)	70
6	DISCUSSÃO.....	73
7	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXOS	105
	ANEXO 1	105
	ANEXO 2	107
	ANEXO 3	109

1 INTRODUÇÃO

O estudo farmacológico de plantas, principalmente as utilizadas na medicina popular tem sido alvo de estudos de muitos pesquisadores. Isto se deve ao fato que o Brasil possui uma flora bastante diversificada e grande parte da população utiliza plantas, na busca do alívio da dor e na cura de doenças. O potencial das plantas como fonte de novos fármacos, oferece grande campo para investigação científica e há um renascimento do interesse do uso de produtos naturais para o tratamento de doenças, assim como para maior conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos (RISHTON, 2008; SCHMIDT et al., 2008).

No mercado mundial de medicamentos, que é da ordem de US\$ 320 bilhões, 40% são derivados de fontes naturais. Atualmente, metade dos fármacos que estão em fase de testes clínicos para uso na medicina humana no mundo, tem como origem produtos naturais. Dentre as 877 moléculas bioativas introduzidas na indústria de medicamentos, entre 1981 e 2002, 61% advém de produtos naturais bioativos e 39% correspondem a produtos de síntese química. Entretanto, a maioria dessas últimas, advém de moléculas naturais com suas propriedades bioativas aumentadas por síntese química combinatória. Estima-se que aproximadamente 25% dos "medicamentos referência" dispensados nos Estados Unidos contém extratos da flora ou ingredientes ativos derivados de plantas. Apesar disto e dos avanços das tecnologias de semi-síntese e do desenvolvimento de medicamentos, somente uma pequena porcentagem de espécies de plantas superiores terrestres no planeta foram investigadas.

Portanto, investir no conhecimento da biodiversidade brasileira e na formação de recursos humanos, é de primordial importância para que o patrimônio genético brasileiro seja conservado e utilizado de forma racional em benefício das populações regionais e do país como um todo.

Neste sentido, há uma escassez de estudos químicos e biológicos da planta *Polygala mollungilifolia*, embora já exista a informação de que outras espécies deste gênero (*Polygala*) possuem significativo efeito anti-inflamatório, como é o caso da *Polygala sabulosa*, efeito observado no modelo de peritonite induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos (BORGES et al., 2014). Desta forma, verificou-se a eficácia anti-inflamatória da planta, além de elucidar quais compostos são responsáveis por tal ação, já que o estudo fitoquímico preliminar da mesma indica a presença de compostos com potencial atividade anti-inflamatória como flavonóides e isoflavonas, compostos que recentemente vêm sendo alvo de muitos estudos por apresentarem baixa toxicidade (MASILAMANI; WEI; SAMPSON, 2012;

YOON et al., 2012; VENZKE et al., 2013). Além disso, esperamos também poder verificar se a *P. molluginifolia* interfere na ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B, principal fator de transcrição nuclear envolvido em processos inflamatórios.

Nesta pesquisa, optou-se por utilizar-se o modelo experimental da pleurisia em camundongos, por ser um método de fácil execução e ser considerado um bom modelo para triagem de atividade anti-inflamatória de produtos naturais e/ou fármacos. Além disso, estudos têm demonstrado que este modelo mimetiza a resposta inflamatória que ocorre na cavidade pleural de pacientes com asma neutrofílica, já que o perfil celular e o comportamento temporal de mediadores é muito semelhante a esta patologia humana (MOORE, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fitoquimicamente a *Polygala molluginifolia* e estudar o efeito e o provável mecanismo de ação anti-inflamatória de extratos, frações e compostos isolados das folhas da mesma no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I) Realizar a caracterização química do extrato bruto por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) no extrato bruto hidroalcoólico, os dois compostos majoritários obtidos pelo método extrativo utilizado;
- II) Avaliar o efeito do EB, frações e compostos isolados, sobre a migração dos leucócitos e a exsudação;
- III) Avaliar o efeito do EB, frações e compostos isolados sobre as atividades da mieloperoxidase (MPO), adenosina-deaminase (ADA), e sob as concentrações de óxido nítrico (NO);
- IV) Avaliar o efeito do EB, frações e compostos isolados sobre as concentrações do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 beta (IL-1 β);
- V) Avaliar o efeito dos compostos isolados sobre a expressão do mRNA do TNF- α e da IL-1 β ;
- VI) Avaliar o efeito dos compostos isolados sobre a fosforilação da subunidade p65 (RelA) do fator de transcrição nuclear (NF- κ B).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas de uso medicinal fazem parte do cotidiano de um grande número de pessoas além de constituírem a fonte primária de uma série de medicamentos modernos. Adicionalmente, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais para os cuidados primários de saúde, devido à pobreza e falta de acesso às alternativas da medicina moderna (CALIXTO, 2005). É importante ressaltar que, em 2001 e 2002, aproximadamente um quarto dos medicamentos mais vendidos no mundo foram produzidos a partir de produtos naturais ou seus derivados. As substâncias oriundas de plantas medicinais podem servir não somente como novas drogas, mas também como protótipos para otimização de estruturas pela química farmacêutica e química medicinal. Desse modo, a descoberta de propriedades terapêuticas de plantas medicinais pode possibilitar o surgimento de alternativas para tratamento de patologias que ainda representam desafios na prática clínica (GURIB-FAKIM, 2006).

A taxa de aprovações de novas entidades químicas, a nível mundial, demonstra que mesmo em 2010, o campo de produtos naturais ainda produz ou está envolvido em aproximadamente 50% de todas as moléculas entre os anos 2000 e 2010. Além disso, entre esses anos, a percentagem de moléculas de origem natural aprovadas variaram de um mínimo de 20,8% em 2009, para uma alta de 50% em 2010, com a média e desvio-padrão para os 11 anos sendo $36,5 \pm 8,6$. Adicionalmente, em 2010, metade das 20 novas moléculas aprovadas eram derivadas de produtos naturais, incluindo a maioria dos agentes antitumorais (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Uma variedade de plantas que apresentam atividade anti-inflamatória já tiveram os compostos responsáveis por tal atividade isolados e caracterizados, como por exemplo, os terpenos presentes na *Matricaria recutita* (os monoterpenos β -bisabolol e azuleno), na *Calêndula officinalis* (os triterpenos taraxasterol e o lupeol), na *Arnica montana* (a lactona sesquiterpênica helenalina), na *Glycyrrhiza glabra* (o triterpeno glicirrizina ou ácido glicirrízico), no *Rosmarinus officinalis* (os triterpenos ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido micromérico), *Salvia officinalis* (o triterpeno ácido ursólico), na *Cordia verbenaceae* (o sesquiterpeno α -humuleno) (BLUMENTHAL, 2003; ALTINIER et al., 2007; FERNANDES et al., 2007). No geral, os produtos naturais fazem parte de uma importante fonte para novos produtos

farmacêuticos. Além disso, os efeitos adversos causados pelos mais conhecidos anti-inflamatórios requerem urgentemente estudos para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de diversas doenças inflamatórias. Portanto, a tendência atual na pesquisa farmacológica é a investigação dos efeitos medicinais dos produtos de origem vegetal devido a disponibilidade e acessibilidade com a promessa de efeitos adversos mínimos (CALIXTO, 2005).

3.2 GÊNERO *POLYGALA*

A espécie *Polygala molluginifolia*, conhecida popularmente como Cãnfora, pertence ao gênero *Polygala* e à família Polygaceae (**Figura 1**). O gênero *Polygala* compreende cerca de 110 espécies no Brasil e 725 no mundo, sendo característico de regiões tropicais e temperadas, sendo encontrada facilmente nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio grande do Sul (PAIVA, 1998; MARQUES; PEIXOTO, 2007). Embora, recentemente o genero *Polygala* tenha chamado a atenção de diversos pesquisadores (CAPRA et al., 2010; KLEIN; DE ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2012; KIM et al., 2013b; BORGES et al., 2014), a *Poligala molluginifolia* especificamente, até o momento não possui estudos na literatura científica quanto a sua composição química e atividade biológica.

Estudos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram que espécies do gênero *Polygala* possuem diversas atividades biológicas. Dentre elas, destacam-se: atividade antiulcerogênicas (KLEIN et al., 2010), ansiolíticas (CAPRA et al., 2010), anticonvulsivante (DUARTE et al., 2008), gastroprotetora (LAPA FDA et al., 2007) e até antineoplásica (PAUL et al., 2010). Nesse contexto, a atividade nociceptiva de espécies do gênero *Polygala* tem sido relatada, dando destaque a atividade do extrato hidroalcoólico e compostos isolados da *Polygala sabulosa*, do extrato hidroalcoólico e xantonas isoladas da *Polygala cyparissias* e do extrato hidroalcoólico e rutina obtidos da *Polygala paniculata* (DE CAMPOS et al., 1997; MEOTTI et al., 2006; RIBAS et al., 2008; LAPA FDA et al., 2009). Além disso, alguns estudos já vem demonstrado o efeito anti-inflamatório de espécies do gênero *Polygala*, como o estudo *in vitro* desenvolvido por Kim et al. (1998), onde o extrato aquoso da *Polygala tenuifolia* inibiu a produção de TNF- α em astrócitos murinos (KIM et al., 1998). Ademais, KOU et al. (2006) também demonstrou que o extrato aquoso da *Poligala japonica* reduziu o edema de orelha induzido por diversos agentes flogísticos em camundongos (KOU et al., 2006).

Quanto a presença de metabólitos secundários, estudos fitoquímicos indicaram a presença de xantonas (CHANG et al., 2007), saponinas (WANG et

al., 2008), antraquinonas, flavonóides (KIM et al., 2009) e fenilpropanóides (CHO et al., 2012), metabólitos reconhecidamente possuidores de ação anti-inflamatória. Outros constituintes das *Polygalas*, as saponinas, a muito se relata seus efeitos anti-inflamatórios como no estudo realizado por Wang e colaboradores (2008), dentre outros efeitos, onde se demonstrou significativa a redução do edema de pata induzida pela carragenina, em camundongos e ratos (ASRES et al., 2005; WANG et al., 2008). Dentre todos os metabólitos secundários citados e isolados no gênero *Polygala*, os flavonóides são sem dúvida os compostos mais estudados quanto a ação anti-inflamatória, já que são capazes de inibir a expressão e a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios (GONZALEZ-GALLEGO; SANCHEZ-CAMPOS; TUNON, 2007; MARZOCHELLA et al., 2011; PELUSO; RAGUZZINI; SERAFINI, 2013; WANG et al., 2014).

Figura 1. *Polygala molluginifolia*



Fonte: Fotografia por Dalila Venzke.

3.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é uma resposta complexa gerada pela presença de um agente provocador de lesão e é fundamentalmente uma resposta de proteção, cuja finalidade é livrar o organismo do agente causador da lesão celular

(microorganismo ou toxina) e das conseqüências dessa lesão, como células e tecidos necróticos. As principais características do processo inflamatório incluem: vasodilatação, aumento do fluxo e permeabilidade vascular, formação de exudato, migração de leucócitos e seu acúmulo no foco da lesão, formação de espécies reativas, liberação de fatores de crescimento e a geração de um novo tecido funcional (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Atraídas a partir da ação de mediadores com função quimiotática e a expressão de moléculas de adesão, as células inflamatórias tais como os leucócitos mononucleares (MNs) e polimorfonucleares (PMNs) migram para o sítio inflamatório. Além disso, juntamente com esse processo ocorre o extravasamento de proteínas plásmáticas dando origem ao edema, resultante do acúmulo de exsudato composto por proteínas, leucócitos e mediadores inflamatórios (POBER; SESSA, 2007).

3.3.1 Neutrófilos

Dentre os PMNs, os neutrófilos fazem parte da primeira linha de defesa na resposta inflamatória aguda tendo a importante função de destruição ou bloqueio do agente causal por meio de múltiplos mecanismos (JAILLON et al., 2013).

Os neutrófilos são células continuamente geradas na medula óssea a partir de células precursoras mielóides e sua produção pode alcançar níveis acima de 2×10^{11} células. Durante a inflamação, o número de neutrófilos é severamente aumentado nos tecidos e com o tempo entram em apoptose e são removidas por macrófagos e células dendríticas (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

Diferentemente dos humanos, o número de neutrófilos circulantes em camundongos é significativamente menor em situações normais. Enquanto nos humanos, 50 a 70 % dos leucócitos circulantes são neutrófilos, em camundongos eles fazem parte de apenas 10 a 25%. Morfologicamente, os neutrófilos circulantes medem aproximadamente de 7 a 10 μm , têm núcleo segmentado e seu citoplasma é rico em grânulos e vesículas secretoras. Dentre os grânulos, três tipos estão presentes nos neutrófilos: grânulos azurófilos (primários), que contém mieloperoxidase; grânulos secundários ou específicos, que contém lactoferrina; e grânulos terciários ou de gelatinase, que contém metaloproteinase de matriz 9 (MMP9 ou gelatinase B). Em relação as vesículas secretoras, essas podem ser mobilizadas pelos neutrófilos para transportar seu conteúdo para a superfície extracelular. Por exemplo, frente a uma ativação, as vesículas secretoras transportam moléculas de adesão (por exemplo, integrinas

β2) para a superfície da membrana do neutrófilo e os grânulos de gelatinase enviam proteases que são capazes de digerir a membrana basal e/ou a matriz extracelular permitindo a sua transmigração (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

Os neutrófilos são capazes de eliminar os patógenos por vários mecanismos, tanto intracelular quanto extracelular. Alguns desses mecanismos são: fagocitose, liberação de enzimas, formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e pela formação de armadilhas extracelulares compostas de DNA nuclear, proteínas e enzimas, que por fim imobilizam o patógeno facilitando a fagocitose (MANTOVANI et al., 2011).

3.3.2 Mononucleares

A migração dos neutrófilos para o tecido inflamado promove o recrutamento de monócitos, células que se diferenciam em macrófagos que são ativados e desativados durante a resposta inflamatória (MANTOVANI et al., 2011; ORTEGA-GOMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013).

Os macrófagos são as principais células do sistema fagocítico mononuclear e têm três principais funções na inflamação: apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação devido a liberação de citocinas e fatores de crescimento. Os sinais de ativação dos macrófagos incluem diversas citocinas (interferon gamma (IFN- γ), fatores estimulatórios de colônias de monócitos e granulócitos e TNF- α), LPS, proteínas da matriz extracelular, entre outros mediadores. Os macrófagos podem ser desativados principalmente pela interleucina 10 (IL-10), fator transformante de colônias beta (TGF- β) e pela redução das citocinas pró-inflamatórias no local na inflamação, que também permite o reparo os tecidos lesionados e a resolução da inflamação (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

No local na inflamação, a migração dos fagócitos mononucleares é mais lenta comparada por exemplo, com os neutrófilos, porém a expectativa de vida dessas células é muito superior caracterizando a maior presença das mesmas em doenças de caráter crônico. Os monócitos e macrófagos ativados liberam uma série de mediadores que amplificam o processo inflamatório incluindo algumas citocinas (interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e TNF- α), quimiocinas e óxido nítrico (NO) (DALE; BOXER; LILES, 2008). Essas células estão presentes e são importantes na fisiopatologia de algumas doenças crônicas como a artrite reumatóide, aterosclerose, retinopatia crônica e lúpus

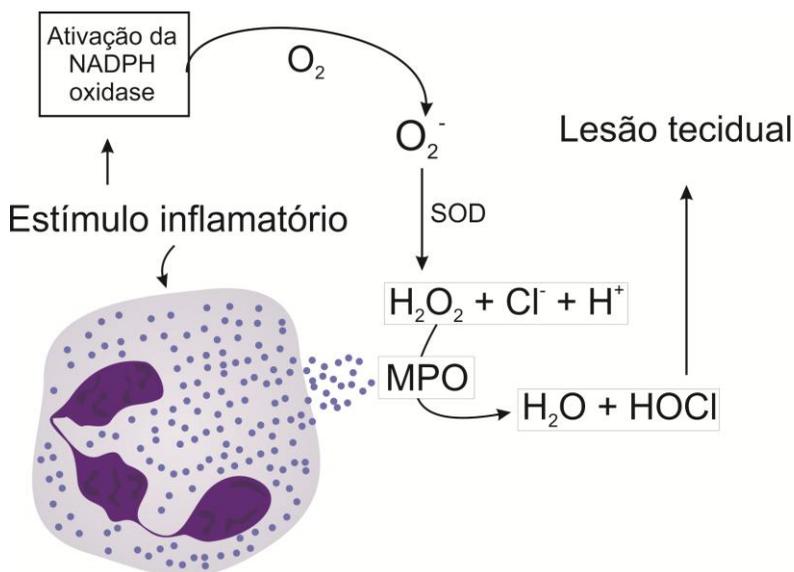
eritematoso sistêmico (KINNE et al., 2000; SCHMID-SCHONBEIN, 2006; DALE; BOXER; LILES, 2008).

Os macrófagos também estão relacionados com a resolução da inflamação, juntamente com os neutrófilos via diferentes mecanismos. Dentre esses mecanismos está o sequestro das citocinas do local da inflamação pelos neutrófilos pela expressão de receptores "armadilhas" para a IL-1, limitando os seus efeitos pró-inflamatórios. Outro mecanismo é a liberação de mediadores lipídicos (resolvinas, lipoxinas e protectinas) que diminuem a migração dos neutrófilos e a fagocitose dos neutrófilos apoptóticos por macrófagos. Além disso, os macrófagos que fagocitam os neutrófilos em apoptose produzem interleucina 10 (IL-10) e interleucina 12 (IL-12), regulando negativamente a inflamação e promovendo reparo tecidual (MANTOVANI et al., 2011).

3.3.3 Mieloperoxidase

Uma vez ativados, os neutrófilos promovem o aumento da liberação e atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), uma protease presente nos grânulos azurófilos e tem importante participação no mecanismo da resposta imune devido a formação de substâncias oxidantes microbicidas e de EROs (MALLE et al., 2007). Durante a fagocitose ocorre a ativação do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxigenase (NADPH), que está envolvida na produção de EROs. A NADPH oxidase reduz o oxigênio molecular ao radical ânion superóxido que é convertida em peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase (SOD), o qual destrói as bactérias diretamente, ou após a sua conversão em íons hidroxila ou ácido hipocloroso (HOCl) (KLEBANOFF, 2005). Entretanto, o aumento de polimorfonucleares ativados e a formação excessiva de EROs podem exercer ações citotóxicas gerando lesões teciduais no próprio hospedeiro (**Figura 2**). O HOCl é capaz de lesionar as células devido a reações de halogenação e nitração em lipídeos, ácido desoxirribonucleico (DNA) e em lipoproteínas (MALLE et al., 2007). Além disso, a liberação da MPO e das EROs geradas para o exterior da célula podem lesionar os tecidos adjacentes (KLEBANOFF, 2005).

Figura 2. Formação de EROs pela MPO



A MPO converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em ácido hipocloroso (HOCl), proveniente da ativação anterior da NADPH oxidase e têm importante ação antimicrobiana e na resposta imune inata. Fonte: Elaborada pelo autor

3.3.4 Adenosina-desaminase

A adenosina é um nucleosídeo de sinalização extracelular importante em diversos processos biológicos, incluindo a modulação da resposta imune e inflamação devido a sua ação em receptores acoplados a proteína G (HASKO; SITKOVSKY; SZABO, 2004). Diferenciados de acordo com a afinidade pela adenosina, esses receptores são classificados em A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 e estão presentes em diversas células, incluindo as células do sistema imune e das vias aéreas (FREDHOLM et al., 2011).

Entretanto, a inflamação é um dos processos em que ocorre um aumento da degradação da adenosina em seu metabólito, a inosina, processo mediado pela enzima adenosina desaminase (ADA) (VAN LINDEN; ELTZSCHIG, 2007). A diminuição da concentração de adenosina para a ordem de picomolar favorece a interação com receptores envolvidos na resposta pró-inflamatória. Por outro lado, em situações fisiológicas a concentração de

produzido a partir da reação de conversão da L-arginina em L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Pelo menos três isoformas desta enzima são conhecidas: duas são constitutivas, presentes em condições fisiológicas: NOS endotelial (eNOS ou NOS1) e NOS neuronal (nNOS ou NOS3). A terceira, a NOS induzida (iNOS ou NOS2), pode ser produzida por meio de um estímulo como a resposta inflamatória (TAKEUCHI et al., 2004; MARIOTTO et al., 2007). A iNOS catalisa a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) no local do estímulo inflamatório. Estes metabólitos são capazes de lesar o ácido desoxirribonucleico (DNA), os lipídios microbianos e as células vizinhas saudáveis, sendo esse o mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios observados em doenças autoimunes (RICCIARDOLO et al., 2004; MENEGAZZI et al., 2006).

Além disso, estes metabólitos promovem a ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- κ B), um dos principais fatores responsáveis por regular a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios (OKAMOTO et al., 2004; KELLEHER et al., 2007). O envolvimento do NO na aterosclerose e nas doenças neuro-degenerativas já é bem conhecido (VALKO et al., 2007) e atualmente tem sido relacionado a doenças inflamatórias contribuindo para sua progressão, como por exemplo, na asma brônquica, artrite reumatóide, osteoartrite e nas doenças inflamatórias intestinais autoimunes (REDDY et al., 2005; NAGY et al., 2007; PAREDI; BARNES, 2009).

3.4 CITOCINAS PRO-INFLAMATÓRIAS

As citocinas são mediadores que podem ser liberados por células dendríticas, neutrófilos, monócitos, linfócitos, macrófagos, dentre outras células (MANDERSCHEID et al., 2004). Estes mediadores, dependendo do estímulo, possuem efeitos pró ou anti-inflamatórios e o balanço entre essas citocinas tem um papel fundamental nos mecanismos regulatórios de defesa do hospedeiro (WILSON et al., 2005; MALAVIYA, 2006). As principais citocinas secretadas pelas células fagocíticas ativadas incluem o TNF- α e a IL-1 β (MANDERSCHEID et al., 2004).

O TNF- α pode ser liberado por diferentes células no local da resposta inflamatória e promove a ativação de outros tipos celulares e a liberação de outras citocinas e mediadores químicos. Como consequência, ocorre o aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio e nos leucócitos o que denota a quimiotaxia celular do vaso sanguíneo para o tecido lesado (SEELY; PASCUAL; CHRISTOU, 2003). Estudos experimentais têm demonstrado a

participação do TNF- α na resposta inflamatória em processos infecciosos (MONTAG et al., 2006), doenças auto-imunes (WILSON et al., 2005) e em situações de trauma (HIETBRINK et al., 2006). Em adição, estudos também têm demonstrado o envolvimento do TNF- α em diversas doenças de caráter inflamatório, dentre elas o diabetes (UNO et al., 2007), a aterosclerose (ZHANG et al., 2007b), a artrite reumatóide (TOUSSIROT; WENDLING, 2007) e a psoríase (TOBIN; KIRBY, 2005).

A IL-1 β é uma citocina com atividade pró-inflamatória e liberada principalmente por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e em menores quantidades por linfócitos B e células *natural killer* (DINARELLO, 2009; MANTOVANI et al., 2011). É uma das citocinas mais estudadas e faz parte da família de citocinas amplamente relacionadas a resposta imunológica inata (DINARELLO, 2009). Esta citocina atua próximo à célula em que foi liberada e ativa a liberação de TNF- α pelos macrófagos, células endoteliais, linfócitos e fibroblastos e IL-6 pelos macrófagos e células hepáticas (HIETBRINK et al., 2006). Tanto o TNF- α como a IL-1 β , além da IL-6, estimulam a produção e a liberação de interleucina 8 (IL-8), uma importante quimiocina responsável pela quimiotaxia neutrofílica (SPEYER et al., 2004; HIETBRINK et al., 2006).

A IL-1 β também está envolvida em diversas doenças de caráter inflamatório, dentre elas citam-se: diabetes tipo 1 (ARIBI et al., 2007), artrite, artrose (FAN et al., 2007), neoplasias (ZHANG et al., 2007a) e processos inflamatórios agudos (BHATIA; MOOCHHALA, 2004).

3.5 FATORES DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR

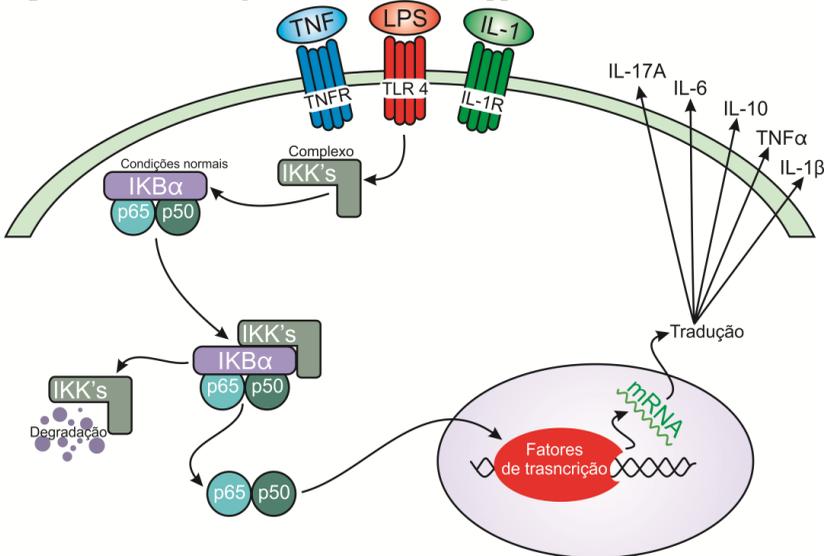
3.5.1 Fator de transcrição nuclear *kappa*-B (NF- κ B)

O fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B), pertencente a família de fatores de transcrição encontrada em quase todos os tipos de células animais, está envolvido na resposta celular a múltiplos estímulos, como estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, vírus, bactérias, dentre outros (MERCURIO; MANNING, 1999; AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; LUQMAN; PEZZUTO, 2010). Além disso, o NF- κ B está relacionado a processos fisiológicos como a imunidade celular, inflamação, proliferação celular, apoptose e desenvolvimento embrionário (JANSSENS; TSCHOPP, 2006). Até o momento, foram identificadas em mamíferos cinco proteínas pertencentes a família do NF- κ B: a RelA (p65), a RelB, a c-Rel, o NF- κ B1 (p50

e seu precursor p105) e o NF- κ B2 (p52 e seu precursor p100). Estas proteínas se apresentam na forma de hetero ou homodimeros, sendo o heterodimero p65/p50 o mais abundante na maioria das células (KUMAR et al., 2004; JANSSENS; TSCHOPP, 2006). Associado a proteínas inibidoras, o NF- κ B mantém-se inativo no citoplasma, pois a interação NF- κ B/I κ Bs inibe o sinal de localização nuclear (JANSSENS; TSCHOPP, 2006).

Está atualmente bem demonstrado que a fosforilação da subunidade p65 do fator de transcrição NF- κ B, e sua translocação do citoplasma para o núcleo promove a transcrição gênica de diversas enzimas inflamatórias e citocinas como o TNF- α e a IL-1 β e diversos outros mediadores pró-inflamatórios (GHOSH; KARIN, 2002; BATRA; BALAMAYOORAN; SAHOO, 2011) (**Figura 4**). Sendo assim, agentes que promovem a inibição da ativação do NF- κ B tem se tornado alvos terapêuticos promissores como agentes anti-inflamatórios (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; LUQMAN; PEZZUTO, 2010).

Figura 4. Via de ativação canônica do NF-kappaB



Em condições inflamatórias, a via de sinalização do NF-κB é ativada por diversos estímulos, entre eles a ativação de receptores específicos por citocinas pró-inflamatórias e LPS. Nesta via, as proteínas inibitórias kappa B cinases (IKKs) são ativadas e fosforilam a proteína inibitória kappa B alfa (IκBα), que sofrerá ubiquitinação deixando de exercer a sua função inibitória sobre as subunidades do NF-κB, p50 e p65. Um vez ativado, o dímero formado pela p50 e p65 se transloca para o núcleo da célula realizando a transcrição nuclear de genes responsáveis principalmente por citocinas pró-inflamatórias. mRNA = RNA mensageiro; IL-1 = interleucina 1; LPS = lipopolissacarídeo; TNFR = receptor de fator de necrose tumoral; TLR4 = receptor do tipo *Toll-like* 4; IL-1R = receptor para interleucina 1; IL-17A = interleucina 17A; IL-6 = interleucina 6; IL-10 = interleucina 10; TNFα = fator de necrose tumoral alfa e IL-1β = interleucina 1 beta. Fonte: Elaborada pelo autor.

3.6 MODELOS DE INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS

Atualmente existem diferentes tipos de modelos experimentais a fim de estudar a resposta e os mecanismos das doenças inflamatórias humanas. Entretanto, mimetizar em modelos animais essas doenças não tem sido uma tarefa fácil nos estudos atuais. E mimetizar a asma brônquica em modelos animais não foge a essa regra, principalmente por se tratar de uma doença complexa e com condições clínicas muito específicas.

Apesar disso, os modelos experimentais que existem atualmente são capazes de simular condições inflamatórias envolvidas na asma, permitindo avaliar parâmetros morfológicos, imunológicos e fisiológicos relacionados a patogênese da doença, além de nos permitir avaliar mediadores importantes e os mecanismos presentes no processo inflamatório. Um dos mais utilizados, o modelo experimental de asma eosinofílica permite avaliar alguns dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na asma alérgica. Neste modelo, utiliza-se camundongos da linhagem BALB/c que são sensibilizados com ovalbumina (OVA). O animal é sensibilizado via inalação e a OVA inicia uma resposta alérgica imediata e uma tardia, que terá os parâmetros inflamatórios, como migração celular e mediadores químicos, avaliados a partir do lavado bronco-alveolar (FUKUNAGA et al., 2007).

Outro modelo frequentemente utilizado na estudo da asma utiliza partículas virais, uma vez que infecções virais são comuns e podem ser mais graves em pacientes com asma brônquica e/ou doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). A inoculação de partículas do vírus Sendai em camundongos (influenza tipo 1, em humanos) e do pneumovírus (vírus sinicial respiratório, em humanos) por via respiratória são alguns dos exemplos de vírus que podem ser empregados nesse modelo. A utilização desse modelo também permite avaliar o remodelamento das vias aéreas, a liberação de mediadores inflamatórios e a celularidade. Em contraste, a utilização desse modelo é limitada devido a necessidade de infra-estrutura adequada e altas condições de biosegurança, considerando o cultivo de vírus e a metodologia empregada. (GRAHAM et al., 1988; TOURDOT et al., 2008).

Em relação a celularidade, muitos pacientes desenvolvem asma com uma resposta inflamatória com predomínio de neutrófilos, de difícil controle e tratamento. Assim, também existem modelos que mimetizam esta condição, como por exemplo a pleurisia que pode ser induzida principalmente por lipopolissacarídeo (LPS) ou pela carragenina (Cg). Para este estudo, a metodologia empregada foi a da pleurisia induzida pela Cg. A Cg é utilizada em ensaios farmacológicos para induzir inflamação local e é útil para avaliar a

contribuição dos mediadores envolvidos nas alterações vasculares e celulares associadas à inflamação. Diversos estudos têm demonstrado que a inflamação induzida pela carragenina envolve a participação de mediadores como prostaglandinas, óxido nítrico, histamina, serotonina e cininas. Além destas substâncias, ocorre a infiltração de neutrófilos e a liberação, a partir destes, de radicais livres e citocinas (POSADAS et al., 2004; CORSINI et al., 2005).

A carragenina é um polisacarídeo sulfatado obtido de algas vermelhas do gênero *Rhodophyceae* capaz de ativar a resposta imune inata por 3 diferentes vias de sinalização celular. A primeira delas é a partir da ligação da carragenina ao receptor *Toll-like 4* (TRL4) gerando duas cascatas de sinalização celular mediadas pela proteína *B-cell leukemia/lymphoma 10* (Bcl-10), a via canônica e a via não canônica. Na via canônica, a ativação da Bcl-10 gera a inativação da proteína inibitória de *NF- κ B essencial modulator* (NEMO) que tem a função de impedir a ação da proteína inibitória kappa B cinase beta (IKK β). Uma vez ativada, a IKK fosforila a proteína inibitória kappa B (I κ B) que sofrerá uma posterior ubiquitinação deixando de exercer a sua função inibitória sobre as subunidades do NF- κ B, p50 e RelA (p65). Um vez ativado, o dímero formado pela p50 e p65 se transloca para o núcleo da célula realizando a transcrição nuclear de genes responsáveis principalmente por citocinas pró-inflamatórias. Na via não canônica, a Bcl-10 desta vez interage com a proteína indutora do NF- κ B (NIK), fosforilando a proteína inibitória kappa B cinase alfa (IKK α) promovendo a translocação do dímero p52 e RelB para o núcleo da célula e a posterior transcrição dos genes envolvidos na produção de citocinas. Além da ligação ao TLR4, a carragenina pode diretamente gerar a formação de EROs, as quais reduzem a concentração da *heat shock protein - 27* (Hsp-27) fosforilada que está relacionada no controle da ativação das proteínas cinases ativadas por mitogeno (MAPK) (BHATTACHARYYA et al., 2010; BORTHAKUR et al., 2012).

O modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos é um modelo de inflamação predominantemente neutrofílica e tem resposta bifásica. Na primeira fase, também chamada de fase recente, ocorre após 4 horas após administração da carragenina na cavidade pleural e é caracterizada pela alta migração de polimorfonucleares, formação de exsudato, liberação de enzimas, ativação do NF- κ B e conseqüentemente a produção e liberação de citocinas. A segunda fase, ou fase tardia, é caracterizada pelo predomínio de células mononucleares e maior formação de exsudato. (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; DALMARCO; FRODE; MEDEIROS, 2002).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A espécie foi coletada em Dezembro de 2010, em uma região próxima ao Rio Pitangui, com coordenadas UTM 593095 e 7231847 na região dos Campos Gerais, Ponta Grossa-PR-Brasil. A identificação da espécie foi feita pela Professora Raquel Lüdke (UFPeI) e foi depositada no herbário FLOR (UFSC) recebendo o número de depósito de 39551.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS

4.2.1 Preparação do extrato Bruto

Primeiramente foi realizada a secagem da *Polygala molluginifolia* por meio de estufa de circulação de ar a uma temperatura de 50°C. O material vegetal seco de todas as partes da *Polygala molluginifolia* (37,0 g) foi triturado e extraído com etanol 96% a temperatura ambiente (três vezes e por um período de setes dias cada) em frasco âmbar. Os extratos foram combinados, filtrados e concentrados sob pressão reduzida a 50°C resultando no extrato bruto (10,4 g) (VENZKE et al., 2013).

4.2.2 Extração líquido-líquido

O extrato bruto da *Polygala molluginifolia* foi submetido à extração líquido-líquido utilizando como solventes o hexano e o acetato de etila. Os extratos foram lavados inicialmente com hexano até a extração exaustiva, o solvente foi removido sobre vácuo, obtendo-se então a fração hexano (222,0 mg). Logo após o restante do extrato bruto foi lavado com acetato de etila até a extração exaustiva obtendo-se a fração acetato de etila (3,66 g). O restante do extrato que não solubilizou nos solventes hexano e acetato de etila foi considerado como a fração aquosa (3,96 g) (VENZKE et al., 2013).

4.2.3 Isolamento e purificação dos compostos

A fração acetato de etila (3,66 g) da *Polygala molluginifolia* foi submetida a cromatografia em coluna (CC) por adsorção em sílica (sílica gel 60), utilizando como eluente um gradiente crescente de acetato de etila (AcOEt)

em hexano, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 7:3, e posteriormente um gradiente crescente de etanol (EtOH) em AcOEt 2:8, 4:6, o que rendeu 41 frações. As 41 frações obtidas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada, utilizando como revelador o anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento. As frações 19 (3:7 AcOEt-hexano) e 31 (AcOEt) foram recristalizadas com metanol (MeOH) o que resultou na obtenção do composto 1 (5,3',4'-trihidroxi-6'',6''-dimetilpirano [2'',3'':7,6] isoflavona, Iso) (180 mg).

Os constituintes da fração aquosa (3,96 g) foram separados pela mesma metodologia citada acima utilizando como eluente um gradiente crescente de hexano (Hex) em AcOEt, 7:3; Hex em AcOEt e MeOH, 5:14:1; Hex em AcOEt e EtOH, 1:19:13 e finalmente em MeOH para obtenção de 30 frações. As frações 15 e 19 (1:19:13, Hex:AcOEt:EtOH) foram combinadas para a obtenção do composto 2 (Rutina, Rut) (28 mg) (Figura 3, B) (VENZKE et al., 2013).

Figura 5. Fluxograma do processo de extração e isolamento dos compostos.

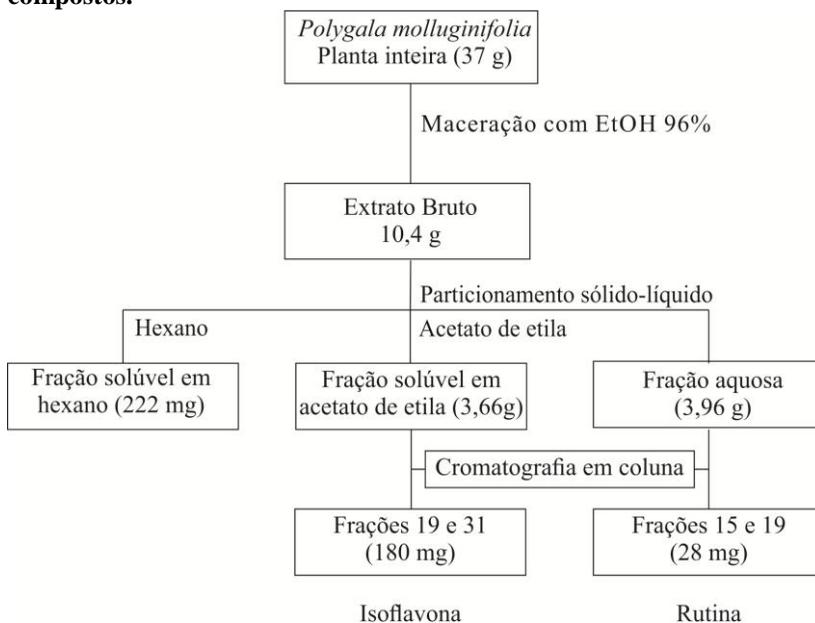
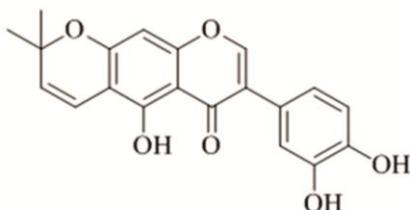
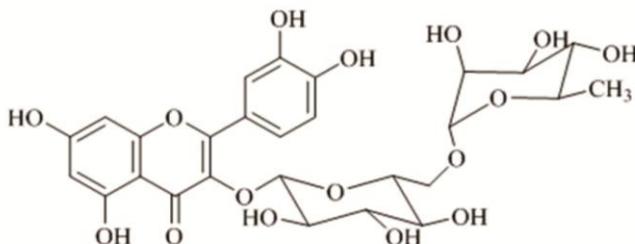


Figura 6. Estrutura química do composto 1 (A) e do composto 2 (B)

A



B



4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DO EXTRATO BRUTO (CLAE-UV)

As análises cromatográficas foram executadas em sistema HPLC modelo LC-20AT (Shimadzu, Kyoto, Japão), injetor automático SIL-20A, equipado com bombas alternadas LC-20AT conectadas a um degaseificador DGU-20A5R, controlador CBM-20A, detector UV-VIS de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A. Sistema interfaceado com o software LC-Solution 1.25SP2.

As análises foram feitas utilizando uma coluna CLC-C₁₈ (ODS, 4,6mm x 250mm), as absorbância medidas na faixa de 200-400nm. Foram utilizados os solventes A (H₂O/MeOH 95:5 + 0,1% de ácido acético (AcOH)) e

B (H₂O/MeOH 5:95 + 0,1% AcOH) iniciando com 30% de B, chegando a 50% de B no tempo de 15 min., aumentando para 75% de B no tempo de 20 min., aumentando para 100% de B no tempo de 35 min., de 35-43 min. em 100% de B, retornando a 30% de B em 45 min. e mantendo-se até o final (50 min.) (Figura 4). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL.min⁻¹; temperatura da coluna de 40°C controlada e volume de injeção foi de 10,0 µL.

Para a quantificação dos compostos majoritários no extrato bruto, padrões previamente validados dos mesmos, foram diluídos com objetivo de obtenção de cinco pontos de concentração diferente, necessários a construção de uma equação da reta. A determinação de cada uma das concentrações foi realizada em triplicata.

4.4 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos albinos suíços, 1 mês de idade, fêmeas, pesando entre 18 e 25 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para cada experimento foram utilizados 5 animais por grupo de tratamento.

Os animais foram acomodados no biotério setorial (Laboratório de pesquisa em imunologia) em gaiolas plásticas (40 x 32 cm) com serragem, sob temperatura (20 ± 2 °C) e luz natural controlados. Estes animais receberam alimentação e água a vontade (*ad libitum*) durante todos os experimentos. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob protocolo PP00757.

4.5 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

A anestesia foi induzida com pentobarbital (25 mg/kg) administrados por via intraperitoneal, a fim de possibilitar a administração da solução corante de azul de Evans (25 mg/kg, i.v., intragengival) com o objetivo de avaliarmos de forma indireta a exsudação.

4.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Quatro horas após a indução da pleurisia, os animais foram sacrificados com *overdose* de pentobarbital (100 mg/kg), administrado por via intraperitoneal.

4.7 PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA

No dia dos experimentos, os animais receberam 0,1 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ou do agente flogístico carragenina (Cg, 1%), administrado na cavidade pleural direita, através do espaço intercostal, utilizando-se de uma agulha 13x5 mm e cânula de polietileno. De acordo com o protocolo experimental, 4 h após a administração da carragenina ou da solução salina estéril, os animais foram sacrificados com *overdose* de pentobarbital. A seguir, os animais foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30° a 45°, sendo feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Posteriormente, o apêndice xifóide foi pinçado e através de duas incisões paralelas ao longo do esterno, a cavidade pleural foi exposta. Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada com duas alíquotas de 0,5 mL (totalizando 1 mL) de solução salina tamponada (PBS, pH 7,6, NaCl (130 mmol/L), Na₂HPO₄ (5 mmol/L), KH₂PO₄ (1 mmol/L) e heparina (20 UI/mL)). Alíquotas do lavado pleural foram coletadas com auxílio de pipeta automática para a quantificação dos números total e diferencial de células.

Utilizando este protocolo, diferentes grupos de animais receberam diferentes doses do EB (50 - 200 mg/kg), frações Aq (10 - 50 mg/kg), AcOEt (10 - 50 mg/kg), Hex (25 - 100 mg/kg) e compostos isolados Iso (1 - 5 mg/kg) e Rutina (2,5 - 10 mg/kg) (i.p.) 30 minutos antes da administração da Cg (i.pl.). Nestes grupos experimentais, 10 minutos antes dos experimentos, os animais foram tratados com solução de Azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL/animal, i.v.), para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural.

Após determinar as melhores doses do EB, frações e compostos isolados, capazes de reduzir a migração de leucócitos e o grau de exsudação, diferentes grupos de animais receberam o EB (200 mg/kg), frações Aq (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg), Hex (100 mg/kg) e compostos isolados Iso (5 mg/kg) e Rutina (10 mg/kg) (i.p.) 30 minutos antes da administração da Cg (i.pl) conforme o protocolo anteriormente descrito. Nestes grupos, os animais não foram previamente tratados com o corante azul de Evans, uma vez que o mesmo interfere na realização das metodologias colorimétricas e para a análise da atividade da MPO e ADA, quantificação das citocinas e metabólitos do NO.

Para a determinação da transcrição do mRNA para as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e proteína p-65 fosforilada, o protocolo

experimental de tratamento e indução da pleurisia foi semelhante ao descrito inicialmente, exceto que o material utilizado para análise foram amostras teciduais dos pulmões (cerca de 200 mg e 20 mg, respectivamente) e sem a administração do azul de Evans. Para a realização destas análises, foram utilizados somente os animais tratados com os compostos isolados Iso (5 mg/kg) e Rutina (10 mg/kg).

Para todos os experimentos, um dos grupos de animais foi tratado com Dexametasona (0,5 mg/kg) 30 minutos antes da administração da Cg, que foi utilizada como droga de referência anti-inflamatória.

4.8 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

No dia dos experimentos, após sacrifício dos animais e abertura das cavidades, alíquotas do lavado pleural (200 μ L) foram reservadas para a contagem celular total, utilizando-se contador hematológico veterinário automático ajustado para parâmetros de camundongo (MINDRAY, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China). Os esfregaços celulares foram realizados para a contagem diferencial dos leucócitos. Após o preparo dos esfregaços em citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, EUA), estes foram corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

4.8.1 Coloração dos esfregaços celulares

A metodologia consiste na coloração sucessiva com uma mistura de eosinato de azul-de-metileno (May-Grünwald) e de azul-eosina (Giemsa). As lâminas contendo o sedimento dos lavados pleurais após centrifugação em citocentrífuga foram secas em posição horizontal à temperatura ambiente. Em suporte de coloração apropriado, as lâminas foram cobertas com 1 mL de corante May-Grünwald e mantidas em contato com o sedimento por 2 min. A seguir adicionou-se água deionizada (1 mL) nas lâminas, com auxílio de pipeta automática com capacidade de 1 mL. Após 3 min, o corante foi removido e cobriu-se a lâmina com corante Giemsa (diluído 1:20 em água deionizada) por 15 min. A seguir, as lâminas foram lavadas em água deionizada e secas à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

4.9 DETERMINAÇÃO DA EXUDAÇÃO

No dia dos experimentos, uma alíquota (200 μL) do lavado pleural foi centrifugada e o sobrenadante foi reservado para a determinação da concentração de Azul de Evans em leitor de enzaimunoensaio (ELISA) (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA), por leitura da densidade ótica, em comprimento de onda 620 nm, de acordo com a metodologia descrita por (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Para a quantificação da concentração de azul de Evans, curvas padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,01 - 50 $\mu\text{g/mL}$) tiveram suas densidades óticas determinadas, e formulou-se uma equação da reta. Os valores das concentrações de azul de Evans nas amostras foram interpolados com base na reta padrão e expressos em $\mu\text{g/mL}$.

4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

Neste grupo de experimentos, logo após o sacrifício dos animais, uma amostra do lavado pleural de camundongos foi coletada e imediatamente processada para a quantificação da atividade da enzima MPO segundo metodologia anteriormente descrita (RAO et al., 1993). Volumes de 20 μL do lavado da cavidade pleural ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos (0,7 - 140 mU/mL)) foram transferidos para as placas de ELISA e a reação bioquímica iniciada com a adição de 180 μL de solução (0,167 mg/mL de o-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H_2O_2). Após 15 min de incubação, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30 μL de azida sódica (1%). A seguir, as placas contendo as amostras foram lidas em densidade ótica (450 nm) em leitor de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). Curvas-padrão com atividades conhecidas da MPO (0,7 - 140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores da MPO foram expressos em mU/mL, com o auxílio da equação da reta.

4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE

Inicialmente amostras padrão com concentrações conhecidas (volume final 2,5 mL) de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e NH_3SO_4 (15 mM) foram preparadas com a finalidade de se obter uma curva-padrão (10 - 50 UI/L). As amostras do lavado pleural (20 μL) foram

centrifugadas e os sobrenadantes foram transferidos para tubos de ensaio e a reação enzimática iniciou-se com a adição da solução de adenosina fosfato (pH 6,5, 500 μL , composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e adenosina (0,5 mM)). Após período de incubação de 1 h a 37°C, a reação enzimática foi bloqueada pela adição da solução (1000 μL) de fenol (1 mM), nitroprussiato de sódio (0,17 mM) e tampão alcalino (1000 μL : NaOCl: 11 mM e NaOH: 125 mM). Esta solução também foi adicionada aos tubos de ensaio contendo concentrações diferentes das amostras padrão (volume final 2500 μL) (GIUSTI; GALANTI, 1984). As absorbâncias das amostras foram lidas em 620 nm em leitor de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). A quantificação da atividade desconhecida da enzima adenosina-deaminase (ADA) foi expressa em U/L, com auxílio da equação da reta.

4.12 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) foi indiretamente quantificado pela formação de seus metabólitos nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), utilizando-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982). No dia dos experimentos, 300 μL de cada amostra do lavado pleural foi submetida à desproteinização. Para cada amostra, foram adicionados 20 μL de solução de sulfato de zinco (20%) e incubadas em banho de gelo por 60 min. As amostras foram centrifugadas (2.000 x g por 15 min.) e o resultado final desta primeira etapa foi a obtenção de um sobrenadante límpido. A seguir, 100 μL do sobrenadante foram transferidos para uma cubeta e diluídos em solução contendo 200 μL de solução saturada de cloreto de vanádio III (0,8%) (p/v) e ácido clorídrico (HCl) (3%) (p/v) (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). Nesta mesma cubeta foram adicionados 300 μL de solução de Griess: sulfanilamida (1%) (p/v), ácido fosfórico (5%) (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v) e incubado durante 40 min., à 37°C. A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades óticas em leitor de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA) em 540 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO_2^- (0 -150 μM) também tiveram as densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato, em μM , com auxílio da equação da reta.

4.13 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS ($TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$)

Neste grupo de experimentos, sem a adição do corante azul de Evans, imediatamente após o sacrifício dos animais, amostras do lavado pleural foram coletadas e centrifugadas para a realização da técnica de ELISA fase sólida, método sanduíche. As sensibilidades identificadas nos kits foram: $TNF-\alpha = 5,0$ pg/mL e $IL-1\beta = 1,67$ pg/mL. Os coeficientes de variação (CV) intra e interensaios observados foram: intra CV: $TNF-\alpha = 7,8 \pm 0,9\%$, $IL-1\beta = 6,2 \pm 0,4\%$; inter CV: $TNF-\alpha = 9,6 \pm 2,1\%$, $IL-1\beta = 5,1 \pm 0,6\%$. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de cada citocina, $TNF-\alpha$ (5,0 - 2300 pg/mL) e $IL-1\beta$ (11,72 - 750 pg/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas em comprimento de onda de 450 nm, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta. As leituras da absorbância de todas as citocinas e suas respectivas curvas-padrão foram realizadas em leitor de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA). Os valores foram expressos em pg/mL.

4.14 DETERMINAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DO mRNA PARA AS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS: $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$

4.14.1 Extração e quantificação do RNA

O RNA total foi extraído de amostras dos pulmões dos camundongos, utilizando-se o Trizol[®], basicamente constituído de uma mistura dos solventes orgânicos fenol e clorofórmio e do detergente inibidor de nucleases isotiocianato de guanidina.

Inicialmente em um tubo tipo eppendorf livre de RNases com capacidade para 2 mL, foi adicionado 1 mL de Trizol[®], e em seguida 200 mg do tecido pulmonar foi mergulhado e imediatamente picotado com auxílio de aparato cirúrgico. O material foi homogenizado com auxílio de vórtex por 30 seg. Após 5 min. de incubação à temperatura ambiente (25°C), foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, e o material homogenizado e incubado por mais 3 min. à temperatura ambiente (25°C). Após a centrifugação do material a 12.000 RPM (4°C) por 15 min., a fase superior (aquosa) foi transferida para outro tubo tipo eppendorf onde adicionou-se 0,5 mL de isopropanol. Novamente, seguiu-se uma incubação por 10 min. à temperatura ambiente (25°C). Terminada esta

etapa, o material foi novamente centrifugado por 10 min. a 12.000 RPM (4°C), e o RNA total presente no sedimento foi recuperado.

Para tanto, o sobrenadante foi desprezado e lavado com 1 mL de etanol (70 %, *v/v*). Finalmente, procedeu-se uma última centrifugação a 7.500 RPM (4°C) por 5 min., e novamente o descarte do sobrenadante com posterior secagem do material em estufa (40°C) por 10 min. A seguir, foi adicionado 100 µL de água livre de RNAses (0,01% DEPC – *v/v*) (DALMARCO et al., 2012).

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

4.14.2 Reação da transcrição reversa (RT)

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

No próximo passo, seguiu-se a adição de 4 µL de solução tampão (First Strand Buffer 5x), 1µL de Oligo-dT (12-18) (100 µM), 1µL de enzima inibidora de RNAses (Ribolock®, 20U) e 1µL da enzima RevertAid® H minus M-MULV Reverse Transcriptase (200 U), totalizando 20 µL de volume final. Esta solução, foi misturada e incubada por 1 h a 60°C. Terminada a incubação, os microtubos contendo agora o DNA complementar (cDNA), foram incubados a 70°C por 15 min com a finalidade de inativar as enzimas adicionadas anteriormente. Finalmente, os microtubos foram armazenados em freezer (-20°C) até o momento da realização das reações de PCR (DALMARCO et al., 2012).

4.14.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas utilizando-se 50 ng de cDNA (obtido na reação de transcrição reversa), primers específicos para os genes de interesse (TNF-α: 0,3 M e IL-1β: 0,1 M) adicionados ao Maxima® SYBR Green ROX qPCR master mix (2X) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA,

USA) totalizando um total de 12,5 μ L de reação. As amostras foram colocadas em placa de 96 poços específicas para realizar a amplificação e quantificação do cDNA em tempo real por meio do equipamento Real Time HT 7900 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

A reação de qPCR foi realizada com as seguintes condições: 1) Incubação a 50 °C durante 2 min. e a 95 °C durante 10 min.; 2) 40 ciclos de amplificação (20 seg. a 95°C, 30 seg. na temperatura específica de cada iniciador e 15 seg. a 95°C). A sequência dos iniciadores específicos para cada gene foi definida com base no programa Primer 3 (versão 0.4.0), com a finalidade de amplificar uma região gênica única (**Tabela 1**).

Como controle positivo de amplificação gênica, foram utilizados iniciadores que amplificam o gene da GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) de expressão constitutiva. Para excluir a possibilidade de contaminação, foram realizados controles negativos contendo água como amostra (ARRUDA-SILVA et al., 2014).

Tabela 1. Oligonucleotídeos (iniciadores) e condições usadas nas reações de RT-qPCR.

Gene	Iniciadores	Produto de amplificação (p. b.)	Temperatura de hibridização (°C)	Registro no GenBank
GAPDH	GTGTCCGTCGTGGATCTGAC GGAGACAACCTGGTCCTCAG	132	50	BC082592.1
TNF- α	CTGGGACAGTGACCTGGACT GCACCTCAGGGAAGAGTCTG	204	50	BC137720.1
IL-1 β	CAGGCAGGCAGTATCACTCA AGGCCACAGGTATTTGTCTG	350	53	BC11437.1

Fonte: Adaptado de ARRUDA-SILVA et al. (2014).

4.15 DETERMINAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA P65 (NF- κ B)

4.15.1 Dosagem de proteínas totais

Após a eutanásia dos animais, 20 mg de tecido pulmonar foi transferido para um tubo eppendorff juntamente com tampão de lise para a formação do homogenato. A partir deste homogenato foi realizada a dosagem de proteínas de acordo com a metodologia descrita por Lowry (1951) (LOWRY et al., 1951) em espectrofotometro no comprimento de onda de 650

nm. Todas as amostras foram ajustadas para 60 mg de proteína para a posterior quantificação da proteína p65 fosforilada.

4.15.2 Quantificação da proteína p65 fosforilada

As amostras ajustadas em concentração igual (60 mg) de proteína foram transferidas para micropoços para a dosagem da proteína p65 fosforilada. Para isso foi utilizado kit comercial com anticorpos monoclonais específicos contra proteína p65 fosforilada de camundongos (Instant One Phospho-NF- κ B p65 (Ser536) ELISA Kit (eBioscience, San Diego, CA, USA)). O procedimento foi realizado protocolo descrito pelos fabricantes. Os resultados foram expressos em mudança relativa comparadas ao grupo controle negativo (Salina), que representou a expressão basal da fosforilação da p65 (ARRUDA-SILVA et al., 2014).

4.16 FÁRMACOS E REAGENTES

Neste estudo, foram utilizados os seguintes fármacos e reagentes: Dexametasona (Ache pharmaceutical laboratories S.A., São Paulo, SP, Brazil), adenosina, azida sódica, Carragenina- λ (grau IV), cloreto de vanádio III, hidróxido de sódio, sulfanilamida, nitroprussiato de sódio, fenol, MPO de neutrófilos humanos, dodecil sulfato de sódio, o-dianisidina 2HCl (3,3' dimetoxibenzidina) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30 %) (Biotech, São Paulo, SP, Brasil), heparina (Liquemine®, Roche, São Paulo, SP, Brasil), fosfato de sódio, sulfato de zinco (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Líquido de Türk, corante de May-Grünwald (Newprov, São José dos Pinhais, PR, Brasil), corante de Giemsa (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil), azul de Evans (Acros-Organics, Nova Jersey, EUA); dihidrocloro de N-(1-naftil)-etilenodiamina (Merck, Darmstadt, Bundesland, Alemanha). Kits de enzimaímunoensaio (ELISA) para quantificação de *TNF- α* e *IL-1 β* de camundongos (BD - Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EUA), iniciadores para reação de cadeia da polimerase (PCR), Trizol[®], Oligo-dT (12-18)[®], dNTPs e DNase grade I[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), RevertAid[®] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit e Ribolock[®] (Fermentas, Burlington, Canadá), Maxima SYBR Green Rox qPCR master mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Kits de enzimaímunoensaio (ELISA) para quantificação da proteína p65 fosforilada (eBioscience, San Diego, CA, USA); acetona, clorofórmio, n-hexano, acetato de etila, metanol e etanol em grau de

pureza analítica (PA) (Synth, Diadema, SP, Brazil). Outros sais e reagentes, de grau de pureza analítica, foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios, incluindo migração celular, exsudação, atividade das enzimas MPO e ADA, concentrações de NO_x, TNF- α , IL-1 β , e transcrição do mRNA para as mesmas citocinas, foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Os resultados foram analisados utilizando o programa de estatística GraphPad Prism[®] versão 3.00 (San Diego, Califórnia, EUA). Diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e os grupos tratados com o material vegetal ou do fármaco de referência (Dexa), foram realizados por meio do teste de variância ANOVA (teste paramétrico bicaudal de duas vias), complementado pelo teste pos-hoc de Dunnett. Quando necessário, utilizou-se o teste *t* de Student (não-pareado). Além disso, foi utilizado o coeficiente de Pearson (Pearson's *r*) para verificar a possível correlação entre a inibição da fosforilação da p65 vs. migração leucocitária e exsudação.

Para todas as análises estatísticas, valores de *P* menores que 0,05 foram considerados indicativos de diferenças significativas.

5 RESULTADOS

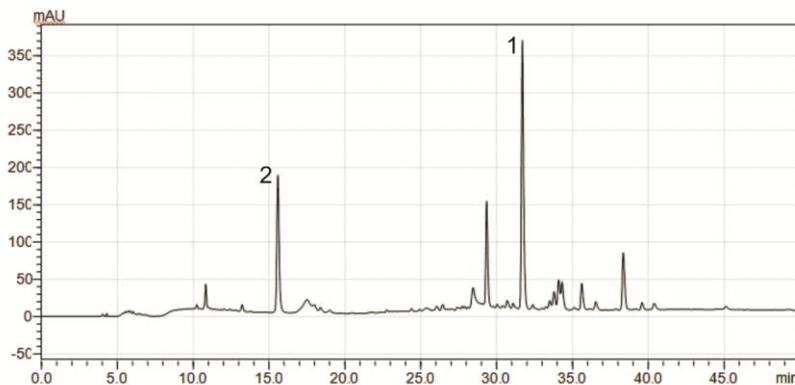
5.1 ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O perfil do CLAE-UV para o extrato bruto foi obtido em comprimento de onda de 254 nm (**Figura 7**). O cromatograma obtido do extrato bruto mostrou quatro picos significantes, sendo que dois deles (compostos majoritários obtidos por cromatografia em coluna) foram identificados como rutina (composto 2) no tempo de retenção de 15,58 minutos, representando 11,54 mg/g do extrato bruto injetado. O segundo pico foi identificado como Iso (composto 1), no tempo de retenção de 31,70 minutos que representou 12,94 mg/g do extrato bruto injetado (**Figura 7**).

A quantificação dos compostos presentes no extrato bruto foi feita a partir de curva padrão para cada composto, que foram produzidas a partir de cinco diferentes concentrações e realizadas em triplicata, onde para a rutina a curva obtida foi $y = 0.363x - 0.183$ ($R^2=0.997$) e para a Iso a curva obtida foi $y = 0.444x - 0.092$ ($R^2=0.999$).

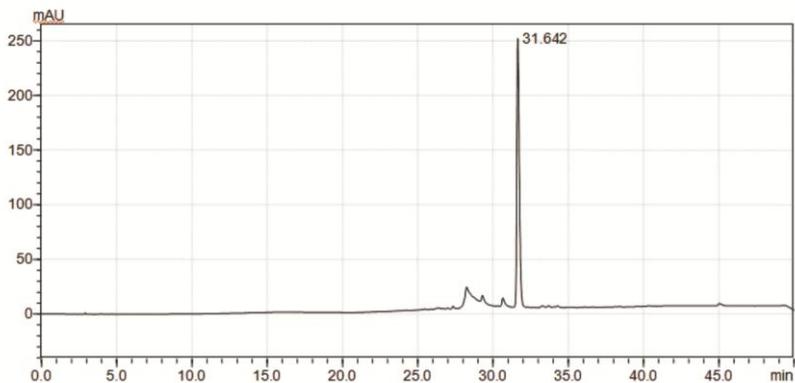
Nas mesmas condições, obtivemos os cromatogramas dos compostos isolados, Iso e Rutina (**Figuras 8 e 9 respectivamente**).

Figura 7. Cromatograma do Extrato Bruto (EB)



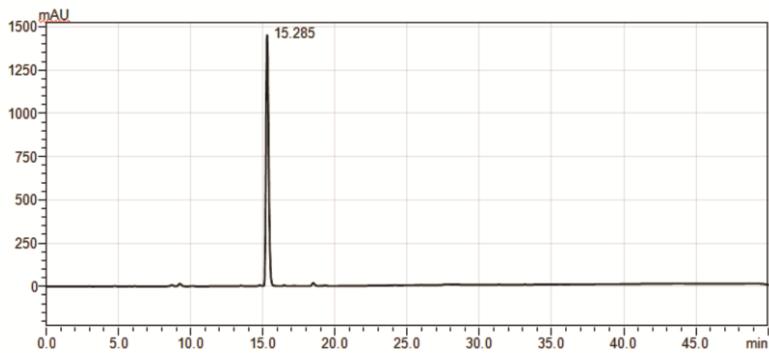
EB (1 mg/mL) em $\lambda = 254$ nm (condições cromatográficas item 4.3). **1.** Pico representando a 5,3',4'-trihidroxi-6'',6''-dimetilpirano [2'',3'':7,6] isoflavona (Iso) e **2.** Pico representando a Rutina (Rut).

Figura 8. Cromatograma do composto 1 (Iso).



Iso (1 mg/mL) em $\lambda = 254$ nm (condições cromatográficas item 4.3).

Figura 9. Cromatograma da rutina.

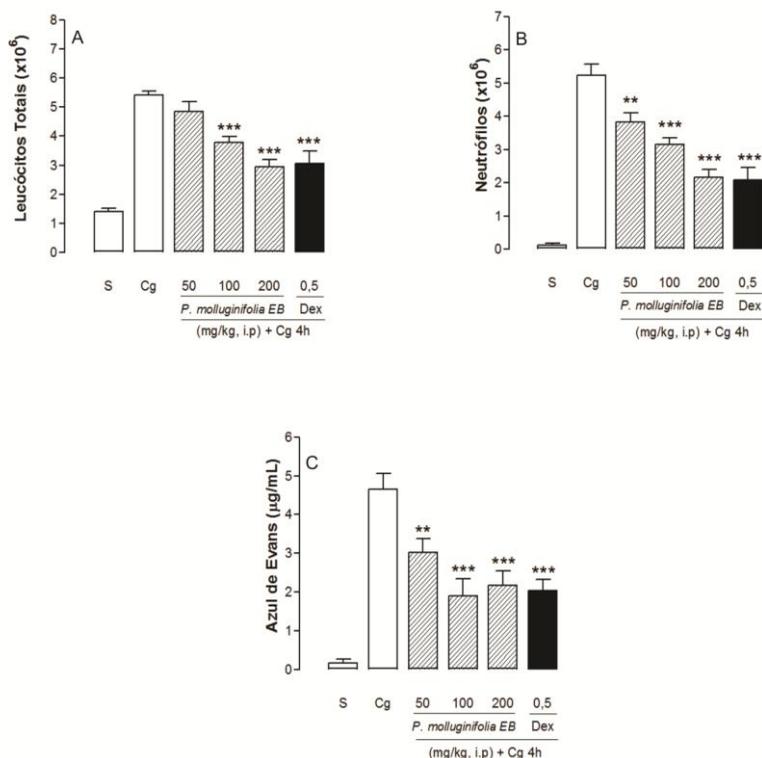


Rut (1 mg/mL) em $\lambda = 254$ nm (condições cromatográficas item 4.3).

5.2 EFEITO DA *Polygala molluginifolia* SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXUDAÇÃO

Na pleurisia induzida pela carragenina, o extrato bruto (EB) da *Polygala molluginifolia* reduziu significativamente a migração de leucócitos nas doses de 100 e 200 mg/kg (% de inibição: 100 mg/kg: $30,2 \pm 3,8$; 200 mg/kg: $45,7 \pm 4,7$), essa redução deveu-se, principalmente a sua capacidade de reduzir a migração de neutrófilos, migração esta que foi inibida de forma significativa nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (% inibição: 50 mg/kg: $27,2 \pm 5,4$; 100 mg/kg: $39,8 \pm 3,7$ e 200 mg/kg: $58,9 \pm 4,7$) ($p < 0,001$) (**Figura 10, A e B**). Além disso, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg foram capazes de reduzir significativamente a exsudação na cavidade pleural, comparada com o controle positivo (% de inibição: 50 mg/kg: $35,3 \pm 7,8$; 100 mg/kg: $59,2 \pm 9,5$ e 200 mg/kg: $53,4 \pm 8,0$) ($p < 0,001$) (**Figura 10, C**).

Figura 10. Efeito do extrato bruto da *Polygala molluginifolia* sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).

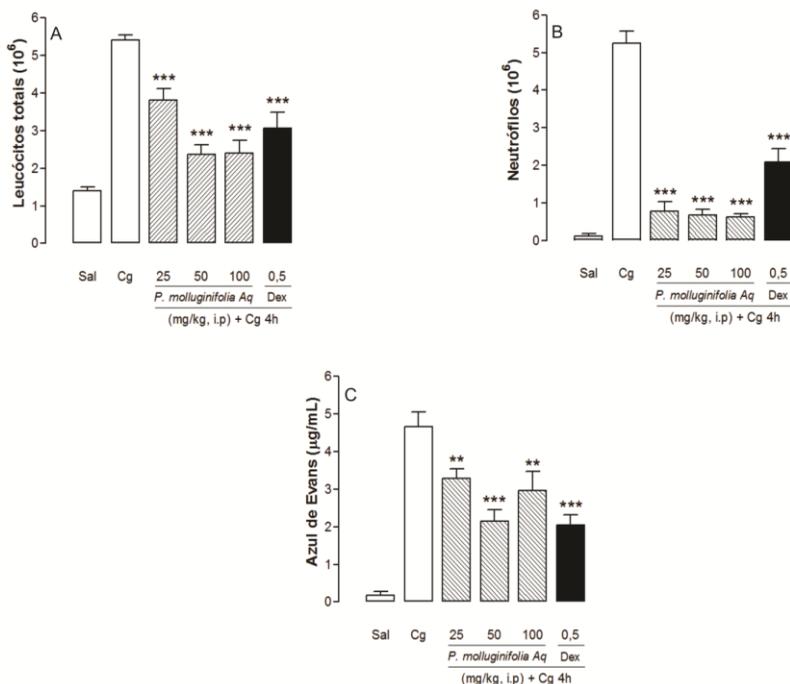


Efeito do extrato bruto (EB) da *Polygala molluginifolia* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas, $n = 5$ animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A fração aquosa (Aq) da *Polygala molluginifolia* também foi capaz de reduzir significativamente a migração de leucócitos nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg (% inibição 25 mg/kg: $29,4 \pm 5,5$; 50 mg/kg: $56,1 \pm 4,5$ e 100 mg/kg: $55,7 \pm 6,1$), redução que também deveu-se, a inibição da migração de neutrófilos por todas as doses testadas (25, 50 e 100 mg/kg) (% inibição: 25 mg/kg: $85,2 \pm 4,9$; 50 mg/kg: $87,0 \pm 2,8$ e 100 mg/kg: $55,7 \pm 6,1$) ($p < 0,001$)

(Figura 11, A e B). Além disso, todas as doses testadas desta fração reduziram significativamente a exsudação na cavidade pleural (% inibição 25 mg/kg: $32,8 \pm 5,0$; 50 mg/kg: $49,0 \pm 5,2$ e 100 mg/kg: $36,2 \pm 10,6$) ($p < 0,001$) (Figura 11, C).

Figura 11. Efeito da fração aquosa (Aq) da *Polygala molluginifolia* sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).

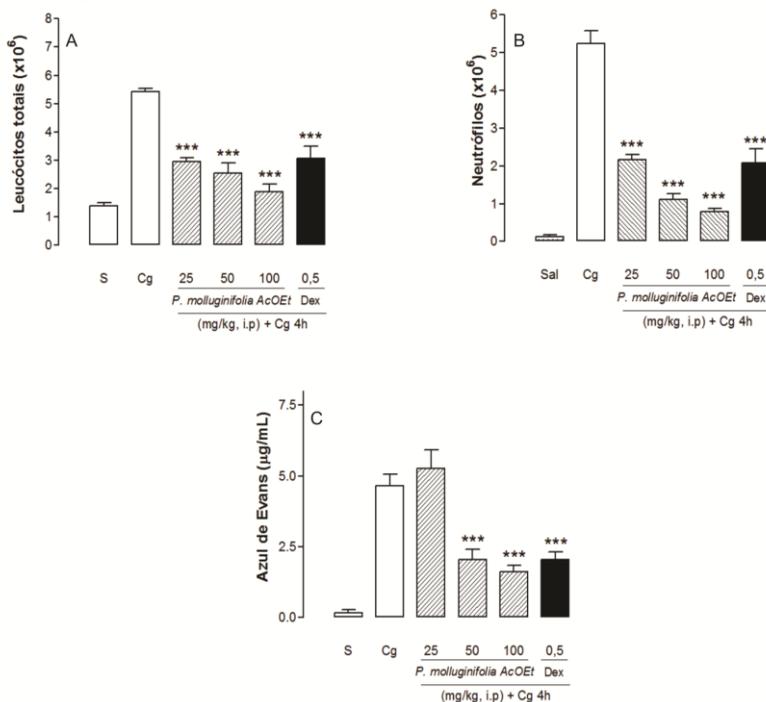


Efeito da fração aquosa (FAq) da *Polygala molluginifolia* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas, $n = 5$ animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Nas mesmas condições experimentais, a fração acetato de etila (AcOEt), nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg reduziu a migração de leucócitos para a cavidade pleural (% inibição: 25 mg/kg: $45,3 \pm 2,5$; 50 mg/kg: $53,1 \pm 7,0$

e $84,7 \pm 1,4$), e esta redução também deveu-se a capacidade da fração em inibir a migração de neutrófilos, observada em todas as doses testadas (% of inibição: 25 mg/kg: $58,6 \pm 2,5$; 50 mg/kg: $78,7 \pm 3,0$ e 100 mg/kg: $64,9 \pm 4,8$) ($p < 0,01$) (**Figura 12, A e B**). Entretanto, somente as doses de 50 e 100 mg/kg foram capazes de diminuir o exsudato formado na cavidade pleural (% of inibição: 50 mg/kg: $56,0 \pm 8,0$ e 100 mg/kg: $65,3 \pm 5,2$) ($p < 0,001$) (**Figura 12, C**).

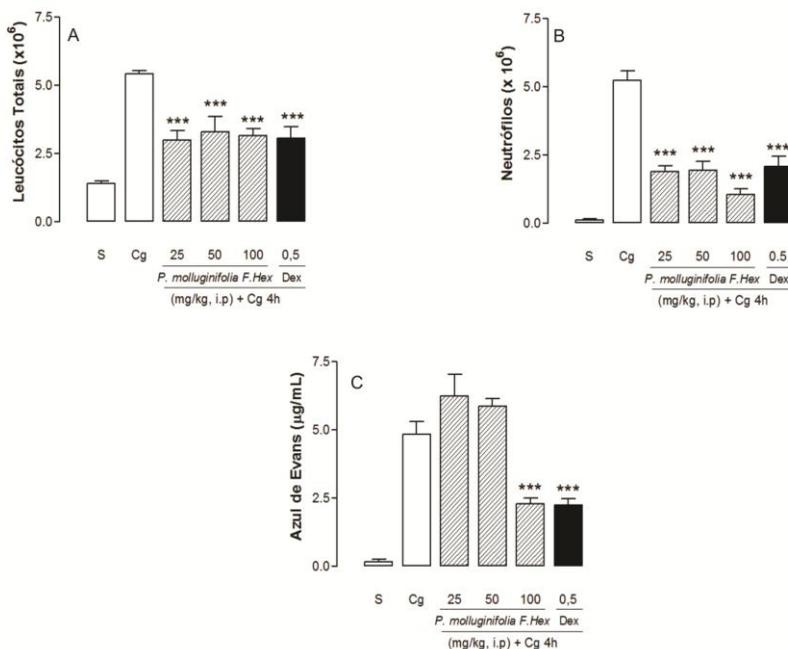
Figura 12. Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) da *Polygala molluginifolia* sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).



Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) da *Polygala molluginifolia* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.p.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas, n = 5 animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A respeito da fração hexano (Hex), todas as doses testadas (25, 50 e 100 mg/kg) foram capazes de inibir a migração de leucócitos (% of inibição: 25 mg/kg: $44,6 \pm 6,4$; 50 mg/kg: $39,0 \pm 10,3$ e 100 mg/kg: $41,8 \pm 4,9$), redução caracterizada principalmente pela inibição da migração de neutrófilos (25 mg/kg: $63,5 \pm 3,6$; 50 mg/kg: $62,9 \pm 6,5$ e 100 mg/kg: $79,6 \pm 3,9$) ($p < 0,001$) (**Figura 13, A e B**). Porém, a exsudação foi apenas reduzida de forma significativa na dose de 100 mg/kg (% de inibição: $50,7 \pm 4,5$) ($p < 0,001$) (**Figura 13, C**).

Figura 13. Efeito da fração hexano (Hex) da *Polygala molluginifolia* sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).

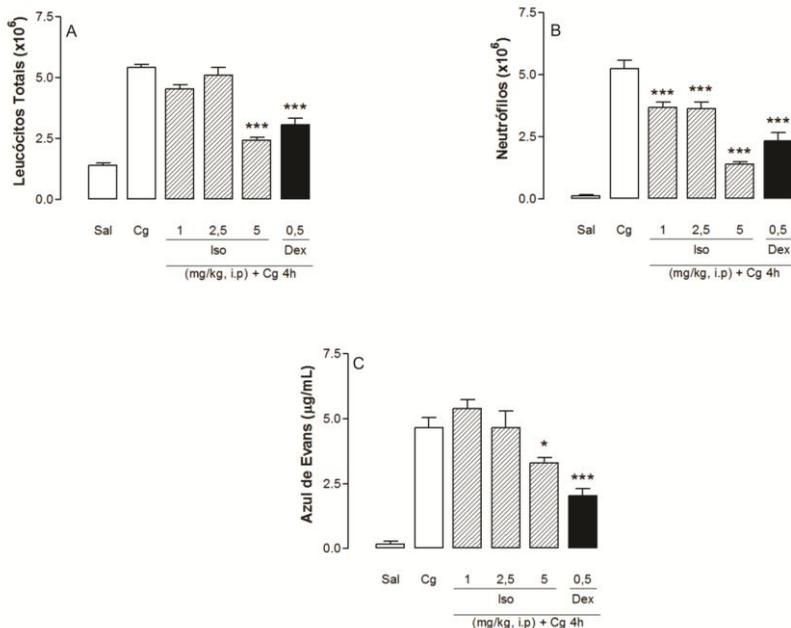


Efeito da fração hexano (Hex) da *Polygala molluginifolia* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas, $n = 5$ animais. *** $p < 0,001$.

Os dois compostos, Iso e a Rutina, foram isolados a partir das duas frações que apresentaram resultados de inibição de forma concomitante na migração leucocitária e exsudação, nas menores doses (AcOEt e Aq, respectivamente). Por este motivo, os experimentos seguintes foram conduzidos no intuito de determinar se estes compostos são os responsáveis, pelo menos em parte, pela atividade anti-inflamatória do extrato bruto da *Polygala molluginifolia*.

O composto 1 (Iso) reduziu significativamente o influxo de leucócitos para a cavidade pleural na dose de 5 mg/kg (% inibição: $55,0 \pm 2,2$), curiosamente todas as doses testadas foram capazes de diminuir significativamente a migração de neutrófilos (% of inibição: 1 mg/kg: $29,9 \pm 4,2$; 2,5 mg/kg: $30,6 \pm 5,0$ e 5 mg/kg: $72,3 \pm 1,8$) ($p < 0,001$) (**Figura 14, A e B**). Já a exsudação na cavidade pleural, também só foi reduzida na dose de 5 mg/kg (% inibição: $29,2 \pm 4,5$) ($p < 0,05$) (**Figura 14, C**).

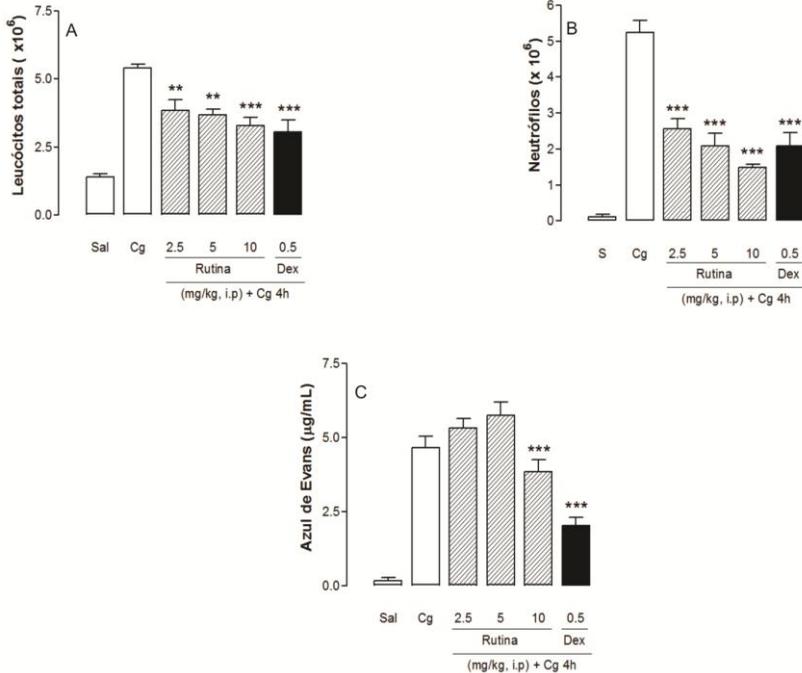
Figura 14. Efeito do composto 1 (Iso) da *Polygala molluginifolia* sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).



Efeito da Iso administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas, $n = 5$ animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Adicionalmente, o composto 2 (Rutina) reduziu significativamente a migração de leucócitos nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg (% inibição: 2,5 mg/kg: $29,1 \pm 7,4$; 5 mg/kg: $32,0 \pm 4,1$ e 10 mg/kg: $39,4 \pm 5,5$), redução também devida a inibição da migração de neutrófilos que ocorreu em todas as doses testadas (2,5 mg/kg: $51,0 \pm 34,7$; 5 mg/kg: $60,1 \pm 6,7$ e 10 mg/kg: $71,5 \pm 1,5$) ($p < 0,001$) (**Figura 15, A e B**). O exsudato formado na cavidade pleural foi reduzido apenas quando os animais foram pré-tratados na dose de 10 mg/kg (% inibição: $47,3 \pm 5,5$) ($p < 0,01$) (**Figura 15, C**).

Figura 15. Efeito do composto 2 (Rutina) da *Polygala molluginifolia* sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).



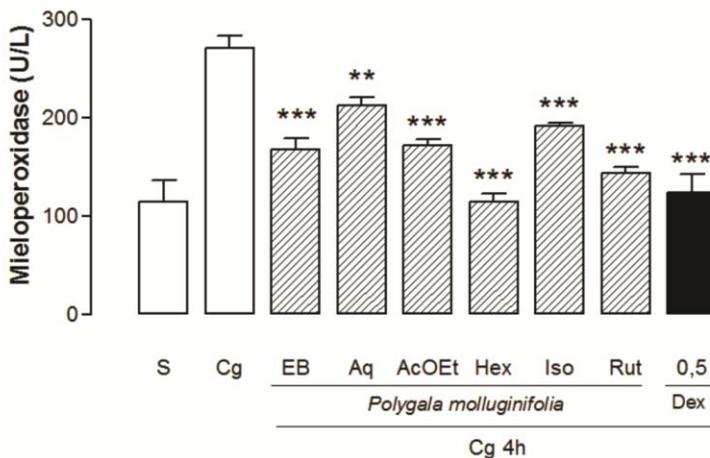
Efeito da Rutina administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 5 animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Com base nos resultados obtidos nos experimentos anteriores, a melhor dose do extrato bruto (100 mg/kg), da fração aquosa (50 mg/kg), da fração acetato de etila (50 mg/kg), da fração hexano (100 mg/kg) e dos compostos isolados Iso (5 mg/kg) e Rutina (10 mg/kg) isolados da *Polygala molluginifolia*, foram escolhidas para a realização dos experimentos seguintes.

5.3 EFEITO DA *Polygala molluginifolia* SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

O tratamento prévio dos animais com o EB (200 mg/kg) e suas frações: Aq (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg) e Hex (10 mg/kg), bem como os compostos isolados, Iso (5 mg/kg) e Rut (10mg/kg) reduziram de forma significativa a atividade da enzima mieloperoxidase (% inibição: EB: $38,0 \pm 4,4$; Aq: $21,6 \pm 3,2$; AcOEt: $36,5 \pm 2,2$; Iso: $29,4 \pm 1,2$ e Rut: $46,8 \pm 2,2$) ($p < 0,01$) (Figura 16).

Figura 16. Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Polygala molluginifolia* sobre a atividade da enzima mieloperoxidase

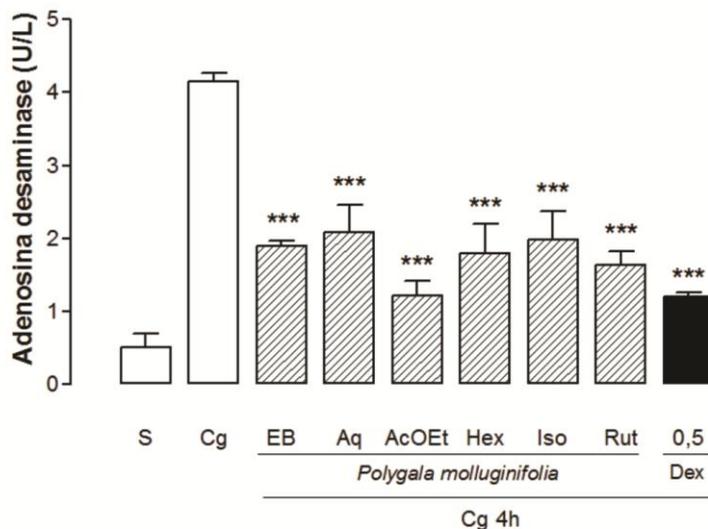


Efeito do EB (200 mg/kg), frações: Aq (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg) e Hex (100 mg/kg) e compostos isolados: Iso (5 mg/kg) e Rut (10 mg/kg), administrados i.p. 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas, $n = 5$ animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.4 EFEITO DA *Polygala molluginifolia* SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE

O tratamento prévio dos animais com o EB (200 mg/kg) e suas frações: Aq (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg) e Hex (10 mg/kg), além dos compostos isolados, Iso (5 mg/kg) e Rut (10mg/kg) também reduziram a atividade da enzima adenosina desaminase no lavado pleural (% inibição: EB: $54,3 \pm 1,6$; Aq: $49,8 \pm 9,0$; AcOEt: $70,5 \pm 4,7$; Iso: $52,1 \pm 9,0$ e Rut: $60,6 \pm 4,5$) ($p < 0,001$) (Figura 17).

Figura 17. Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Polygala molluginifolia* sobre a atividade da enzima adenosina desaminase

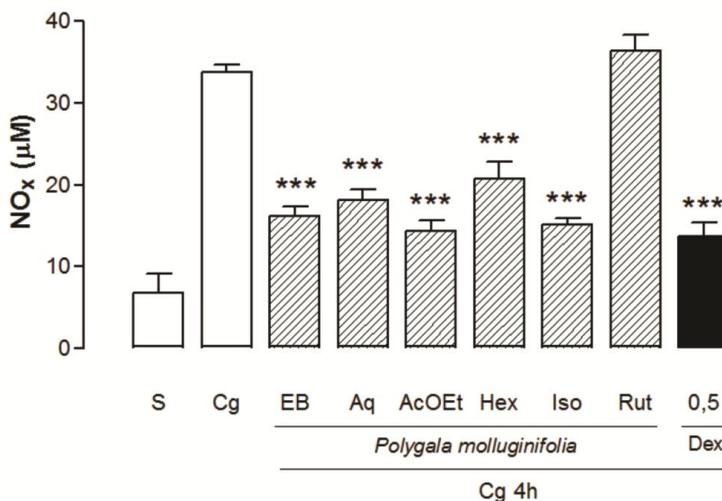


Efeito do EB (200 mg/kg), frações: Aq (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg) e Hex (100 mg/kg) e compostos isolados: Iso (5 mg/kg) e Rut (10 mg/kg), administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas, $n = 5$ animais. *** $p < 0,001$.

5.5 EFEITO DA *Polygala molluginifolia* SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO E NITRITO

O tratamento prévio dos animais com o EB (200 mg/kg) e suas frações: Aq (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg) e Hex (10 mg/kg), e o composto isolado Iso (5 mg/kg) reduziram as concentrações de NO_x (% inibição: EB: 51,9 ± 3,4; Aq: 46,4 ± 4,0; AcOEt: 57,4 ± 3,8 e Iso: 55,2 ± 2,2) ($p < 0,001$) (**Figura 18**). Já o composto Rutina, não foi capaz de inibir este parâmetro inflamatório na dose testada ($p > 0,05$).

Figura 18. Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Polygala molluginifolia* sobre a concentração de nitrito/nitrato

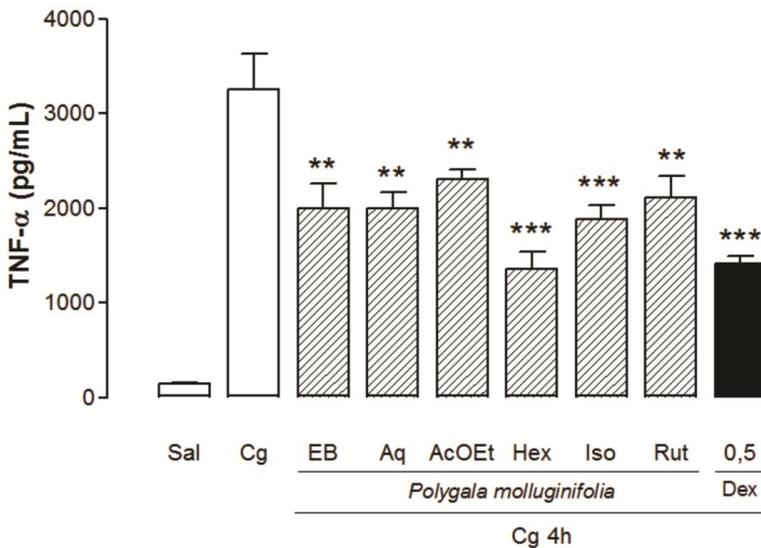


Efeito do EB (200 mg/kg), frações: Aq (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg) e Hex (100 mg/kg) e compostos isolados: Iso (5 mg/kg) e Rut (10 mg/kg), administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média ± e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 5 animais. *** $p < 0,001$.

5.6 EFEITO DA *POLYGALA molluginifolia* SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA

Nos animais tratados com o EB (200 mg/kg) e suas frações: Aq (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg) e Hex (10 mg/kg), e com os compostos isolados Iso (5 mg/kg) e Rut (10 mg/kg), apresentaram redução significativa nas concentrações de TNF- α na cavidade pleural (% inibição: EB: $38,4 \pm 7,8$; Aq: $29,8 \pm 5,0$; AcOEt: $29,0 \pm 3,1$; Iso: $42,1 \pm 4,5$ e Rut: $35,0 \pm 7,0$) ($p < 0,01$) (Figura 19).

Figura 19. Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Polygala molluginifolia* sobre a concentração de TNF- α

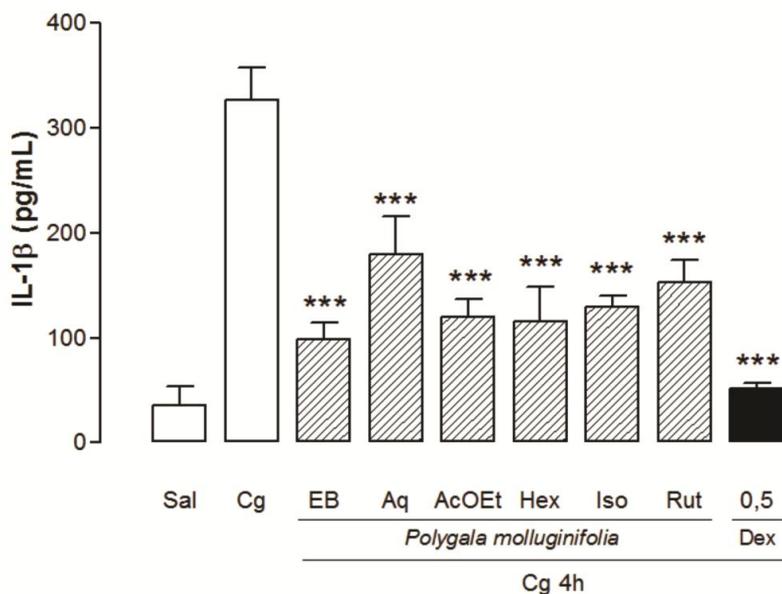


Efeito do EB (200 mg/kg), frações: Aq (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg) e Hex (100 mg/kg) e compostos isolados: Iso (5 mg/kg) e Rut (10 mg/kg), administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 5 animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.7 EFEITO DOS DA *POLYGALA molluginifolia* SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE INTERLEUCINA-1 BETA

Em relação ao efeito do material vegetal sobre as concentrações de IL-1 β , o EB (200 mg/kg) e suas frações: Aq (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg) e Hex (10 mg/kg), e os compostos isolados Iso (5 mg/kg) e Rut (10 mg/kg), também reduziram significativamente as concentrações dessa citocina (% inibição: EB: 65,9 \pm 3,7; Aq: 54,8 \pm 6,3; AcOEt: 67,7 \pm 3,1; Iso: 63,1 \pm 1,6 e; Rut: 58,0 \pm 5,7) ($p < 0,001$) (Figura 20).

Figura 20. Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Polygala molluginifolia* sobre a concentração de IL-1 β



Efeito do EB (200 mg/kg), frações: Aq (50 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg) e Hex (100 mg/kg) e compostos isolados: Iso (5 mg/kg) e Rut (10 mg/kg), administrados i.p. 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 5 animais. *** $p < 0,001$.

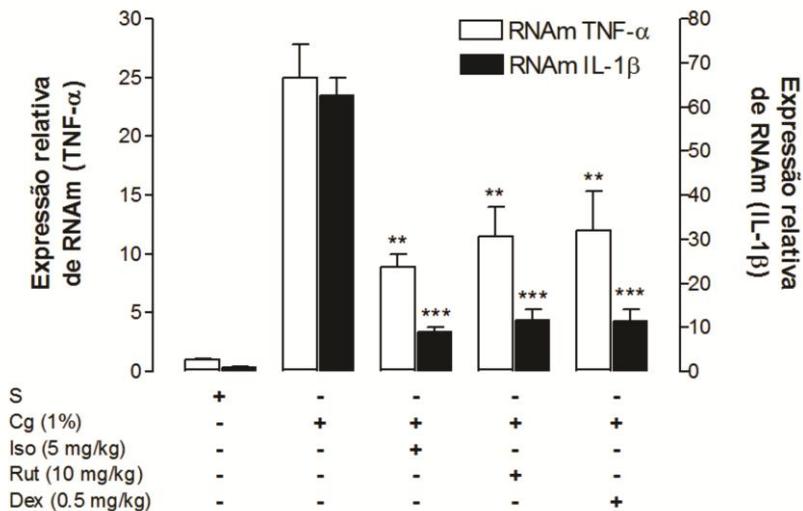
5.8 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA *POLYGALA molluginifolia* SOBRE A EXPRESSÃO DE RNA_m DO TNF- α E IL-1 β

Uma vez que os compostos isolados da *P. molluginifolia* mantiveram o mesmo perfil de inibição que o extrato bruto e frações, sobre os parâmetros inflamatórios estudados quando testados isoladamente, podemos atribuir pelo menos em parte o efeito anti-inflamatório da planta, a presença dos mesmos nas respectivas frações e conseqüentemente no extrato bruto.

O próximo passo dos experimentos, foi verificar se a inibição nas concentrações de cada uma das citocinas pró-inflamatórias testadas seria efeito de inibição produzida pelos compostos a nível transcricional, ou se esta inibição é um fenômeno de controle pós transcricional. Para responder a esta pergunta, realizamos a análise do efeito dos compostos isolados sobre a expressão do RNA mensageiro para cada uma das citocinas estudadas.

Nestes experimentos, os resultados obtidos pela metodologia de *PCR* em tempo real, demonstraram que os compostos isolados da *Polygala molluginifolia* foram capazes de reduzir de forma significativa a expressão do RNA_m, tanto do TNF- α (% de inibição: Iso: $54,0 \pm 10,0$; Rut: $45,8 \pm 5,1$) quanto da IL-1 β (% de inibição: Iso: $85,8 \pm 1,7$; Rut: $81,6 \pm 4,0$) ($p < 0,01$) (**Figura 21**).

Figura 21. Efeito dos compostos isolados da *Polygala molluginifolia* sobre a expressão de RNAm do TNF- α e IL-1 β



Efeito dos compostos isolados (Iso e Rut) administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Iso = animais previamente tratados com 5,3',4'-triidroxi-6",6"-dimetilpirano[2",3":7,6] isoflavona (5 mg/kg, i.p.) antes da administração da Cg, Rut: animais previamente tratados com a Rutina (10 mg/kg, i.p.) antes da administração da carragenina, Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). Expressão relativa do RNAm foi obtida por meio da metodologia do $2^{-\Delta\Delta CT}$. As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 5 animais. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

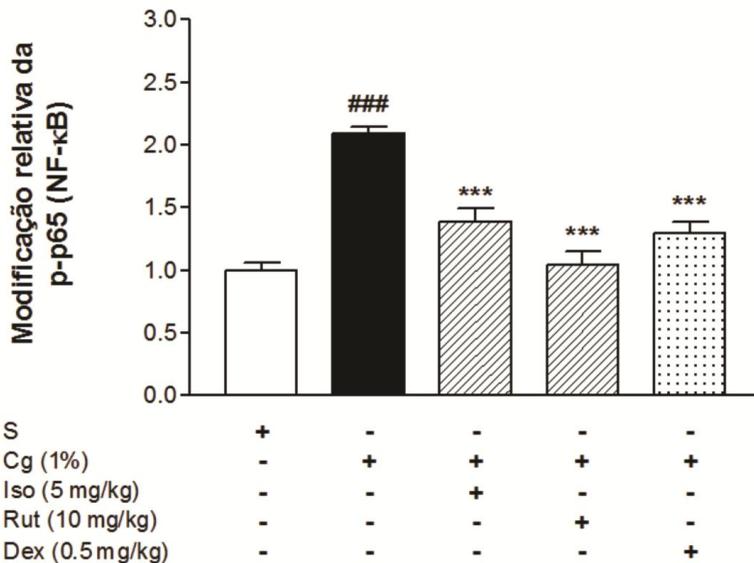
5.9 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS SOBRE A PROTEÍNA p65 FOSFORILADA (NF- κ B)

Uma vez verificada que a inibição dos compostos sobre a produção das citocinas pró-inflamatórias se deu a nível transcripcional, o próximo passo foi analisar o efeito dos mesmos sobre a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B, mais especificamente a subunidade p65. O NF- κ B é um dos fatores de transcrição nucleares mais importantes e comprovadamente envolvidos nos processos inflamatórios e tem participação central na síntese do óxido nítrico, assim como das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , além de muitos outros mediadores pró-inflamatórios. Nestes experimentos, tanto a Iso (5 mg/kg) quanto a Rut (10 mg/kg) foram capazes de inibir a fosforilação da proteína p65, em comparação ao grupo controle não inflamado (% of inibição: $33,7 \pm 5,0$ e $50,1 \pm 5,2$, respectivamente) ($p < 0,001$) (**Figura 22**).

Além disso, foram verificadas correlações fortemente positivas entre a inibição da migração de leucócitos e a inibição na fosforilação da proteína p65 (Leuc. vs. p-p65, $r = 0,993$) e também entre a inibição da exsudação e a inibição na fosforilação da proteína p65 (Exud. vs. p-p65, $r = 0,926$) nos animais que foram pré tratados com o composto Iso antes da administração da carragenina ($p < 0,01$). De forma semelhante, também verificamos uma correlação positiva entre a migração de leucócitos e a inibição na fosforilação da p65 (Leuc. vs. p-p65, $r = 0,995$) e entre a exsudação e a inibição na fosforilação da p65 (Exud. vs. p-p65, $r = 0,970$) nos animais pré tratados com o composto Rut ($p < 0,01$).

Esses dados nos fornecem fortes evidências de que o efeito anti-inflamatório do material vegetal, pode ser atribuído em parte a presença dos compostos isolados, e está relacionado com a habilidade dos mesmos em inibir a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B, o que por sua vez reduz a síntese dos mediadores inflamatórios reduzindo de forma significativa a resposta inflamatória na cavidade pleural.

Figura 22. Efeito dos compostos isolados (Iso e Rut) da *Polygala molluginifolia* sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B.



Efeito dos compostos isolados (Iso e Rut) administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.p.), Iso = animais previamente tratados com 5,3',4'-triidroxi-6",6"-dimetilpirano[2",3":7,6] isoflavona (5 mg/kg, i.p.) antes da administração da Cg, Rut: animais previamente tratados com a Rutina (10 mg/kg, i.p.) antes da administração da carragenina, Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 5 animais. Os resultados foram expressos em modificação relativa em comparação com o grupo Salina (S), que representa a fosforilação basal da p65. *** $p < 0,001$, análise comparativa entre os grupos tratados e o grupo controle positivo (Cg). ### $p < 0,001$, análise comparativa entre o grupo Cg e o grupo Salina (S).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstrou-se pela primeira vez o efeito anti-inflamatório do EB, frações e compostos isolados da *Polygala molluginifolia* utilizando um modelo experimental *in vivo*. No modelo utilizado, o de pleurisia induzida pela carragenina, observou-se que o material vegetal obtido da *Polygala molluginifolia* foi capaz de reduzir a migração de leucócitos, além de reduzir a formação de exsudato na cavidade pleural durante a primeira fase (4 horas) da inflamação induzida pela carragenina. O modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, é um modelo útil para a triagem de novos fármacos anti-inflamatórios, particularmente aqueles derivados de produtos naturais e possui um perfil bimodal (4 e 48 horas); na fase inicial ocorre uma significativa migração de leucócitos, que ocorre devido a ativação de neutrófilos 4 horas após a administração da carragenina (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Essa resposta inicial está associada com uma reação inflamatória caracterizada pela polarização Th17 nas vias aéreas. Embora este modelo não se encaixe nos critérios de um modelo de asma, a resposta inflamatória induzida por este agente flogístico mostra algumas características específicas, dentre elas a migração e ativação massiva de neutrófilos para a cavidade pleural e modificações histológicas pulmonares que são similares as observadas na asma neutrofílica humana (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; DALMARCO; FRÖDE, 2007; ARRUDA-SILVA et al., 2014).

Um fato a ser destacado é que a redução da migração de leucócitos pelo material vegetal, se deu principalmente às custas da inibição da migração de neutrófilos. Este fato é relevante, uma vez que nessa fase do modelo utilizado, ocorre o aumento significativo do recrutamento deste tipo celular para cavidade pleural (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Recentemente Borges e colaboradores (2014) verificaram resultado similar, porém com outra espécie de *Polygala* (*Polygala sabulosa*), onde foi evidenciado que a planta foi capaz de inibir a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, no modelo de peritonite induzida por LPS (BORGES et al., 2014). Outro resultado importante a inibição da exsudação, verificada nos experimentos, também foi verificada por Wang e colaboradores (2008), que demonstraram redução significativa na formação de edema quando os animais foram tratados com *Polygala japonica*, no modelo de edema de pata induzido pela carragenina em camundongos (WANG et al., 2008).

No processo inflamatório, inicialmente ocorre a ativação de células envolvidas na resposta de fase aguda, como os neutrófilos. Esta ativação promove a liberação de EROs e ERNs, tais como: peróxido de hidrogênio,

ânion superóxido, óxido nítrico e radicais hidroxila (ZARBOCK; LEY, 2009), como resultado da ativação de diversas enzimas pró-inflamatórias, com destaque para a iNOS, NAPH oxidase e MPO. Evento similar ocorre posteriormente, com a ativação dos mononucleares que são as células envolvidas após o reconhecimento inicial do agente lesivo, e no desenvolvimento da resposta imune adquirida presente também nos eventos que ocorrem na inflamação crônica (THOMAS; WITTING; DRUMMOND, 2008). No processo inflamatório induzido pela carragenina, não é diferente. A ativação de neutrófilos e células mononucleares que promovem a liberação de enzimas, como a MPO que atua formando EROs para destruição do agente lesivo (KLEBANOFF, 2005), e a ADA, responsável pela degradação da adenosina que em alta concentração (micromolar) tem efeitos anti-inflamatórios (BLACKBURN et al., 2009). Além disso, há a liberação e produção de diversos mediadores inflamatórios, como o NO, que é responsável por aumento de permeabilidade vascular com consequência sobre a produção da exsudação, que em última instância auxilia na migração celular ao local do processo (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Além disso, a ativação celular na resposta inflamatória gera um grande aporte de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, responsáveis pela maturação, diferenciação e ativação de células do sistema imune. Esses mediadores podem se encontrar pré-formados no citoplasma celular, como é o caso da pró-IL-1 β que após estímulo inicial pró-inflamatório há a formação do inflamassoma que processa a pró-caspase 1 em caspase 1, clivando a pró-IL-1 β em IL-1 β madura, que então é liberada no ambiente extracelular produzindo seus efeitos (DINARELLO, 2009). Ainda, há a deflagração de cascatas de sinalização intracelular o que por sua vez leva a estimulação de fatores de transcrição nuclear, como o fator NF- κ B, o principal fator de transcrição responsável pela transcrição gênica de mediadores pró-inflamatórios (HOESEL; SCHMID, 2013).

No presente estudo, tanto o extrato bruto quanto as frações derivadas e os compostos isolados, foram capazes de reduzir de forma significativa a atividade das enzimas MPO e ADA, fato verificado principalmente a nível extracelular. O principal motivo deste efeito reside no fato que o material vegetal foi capaz de reduzir a migração de células inflamatórias para o sítio inflamatório. A MPO, além de possuir alta capacidade microbicida, tem função de favorecer o recrutamento de neutrófilos, pois modifica o padrão eletrostático do endotélio, o que facilita a interação dos mesmos com quimiocinas e moléculas de adesão (NUSSBAUM et al., 2013). Inibição semelhante também foi verificada nos experimentos realizados por Borges e colaboradores (2014),

como citado anteriormente, onde foi demonstrado que a *Polygala sabulosa* inibiu a migração de leucócitos e esta inibição se deu principalmente pela capacidade da planta em inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, no modelo de peritonite induzida pelo LPS (BORGES et al., 2014).

Embora existam poucos estudos na literatura sobre o genero *Polygala*, os compostos isolados da planta são descritos na literatura, dados relacionados com a capacidade de inibição sobre mediadores pró-inflamatórios, como é o caso do estudo desenvolvido por Wang e colaboradores (2012), onde a rutina demonstrou capacidade de inibição sobre a produção de NO, e também sobre diversas enzimas pró-inflamatórias como a mieloperoxidase (WANG et al., 2012). Neste mesmo contexto, a afrormosin uma isoflavona isolada de *Amburana cearensis* A. C. Smith, foi capaz de reduzir de forma significativa a degranulação neutrofilica afetando a atividade da MPO, em um modelo que utilizou neutrófilos humanos isolados estimulados com n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e também por acetato de forbol miristato (PMA) (DE ARAUJO LOPES et al., 2013).

No presente estudo foi demonstrado que a planta possui capacidade de inibir a ADA, enzima com papel central durante o processo inflamatório. Conforme citado anteriormente, a redução da atividade dessa enzima favorece um maior aporte de adenosina que pode possuir efeito anti-inflamatório ao ativar receptores A2a (BLACKBURN et al., 2009). Estudos recentes mostram que a adenosina também está presente em neutrófilos, em menores concentrações que nas células mononucleadas, mas que contibui para a homeostase da inflamação. Impellizzeri et al. (2010) demonstrou em um estudo que a utilização de um agonista específico do receptor A2a da adenosina, causou diminuição na inflamação pulmonar aguda induzida pela carragenina em camundongos, por reduzir a infiltração de neutrófilos, a ativação do NF- κ B, a peroxidação lípidica, a produção de NO e reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IMPELLIZZERI et al., 2011). No presente estudo, o EB, frações e compostos isolados tiveram ação significativa sobre a atividade da ADA. Embora também não existam relatos sobre a atividade deste gênero diretamente sobre a atividade desta enzima, a *P. molluginifolia* é uma planta rica em compostos fenólicos. De Bona e colaboradores (2014), evidenciaram que o extrato da *Syzygium cumini* planta rica em compostos fenólicos, foi capaz de reduzir a atividade desta enzima em um modelo *in vitro* de eritrócitos humanos expostos a altas concentrações de glicose (DE BONA et al., 2014). Além disso, Schmartz e colaboradores (2013) também verificaram este mesmo efeito, quando ratos submetidos à diabetes experimental pela streptozotocina, foram

tratados com vinho e suco de uva, ricos em compostos fenólicos, como rutina e isoflavonas (SCHMATZ et al., 2013).

Outro mediador inflamatório o NO, que se encontra aumentado em processos inflamatórios devido a sua formação a partir da iNOS, também se mostrou reduzido nos animais tratados com o material vegetal, exceto nos animais tratados com a rutina. O NO é caracterizado como o mais importante fator relaxante derivado do endotélio, e exerce funções autócrinas e parácrinas mantendo o tônus vascular e a permeabilidade microvascular. Os efeitos do óxido nítrico na resposta inflamatória são complexos e envolve a quimiotaxia de leucócitos e o aumento da permeabilidade vascular, o que acaba por favorecer o aumento da exsudação (VON KNETHEN; SOLLER; BRUNE, 2007). Quando o processo inflamatório é estabelecido, a enzima iNOS é expressa nas células endoteliais e é a principal fonte geradora de NO (LUIKING; ENGELN; DEUTZ, 2010). Os macrófagos e as células endoteliais estimuladas por citocinas pró-inflamatórias, como o *TNF- α* e a *IL-1 β* , induzem a ativação da enzima iNOS, e conseqüentemente ocorre aumento nas concentrações de NO (VAJDOVICH, 2008). Além disso, experimentos realizados com animais nocautes para iNOS demonstraram que há relação direta entre a redução da exsudação e concentrações de NO no modelo de pleurisia induzida pela carragenina (CUZZOCREA et al., 2001). A redução na produção do NO, também foi verificada por outros autores quando utilizaram outras espécies do gênero *Polygala*. Li e colaboradores (2012), em um estudo *in vitro* em células BV-2 estimuladas com LPS, seguindo de tratamento com extratos da *Polygala tricornis*, obtiveram uma inibição significativa da produção de NO (LI et al., 2012). Cho e colaboradores (2012) demonstraram significativa redução da produção de NO, também por células BV-2 da microglia estimuladas com LPS, após o tratamento com constituintes da *Polygala tenuifolia* (CHO et al., 2012). Com isso, os resultados obtidos no presente estudo permitem sugerir que a diminuição do exsudato verificado no tratamento dos animais com a *Polligala molluginifolia*, pode estar diretamente relacionado com a capacidade da planta em reduzir a produção e/ou liberação de NO.

Em contraste, a Rutina foi capaz de reduzir a exsudação, porém, não reduziu a produção de NO. Esse resultado suporta a hipótese de que pelo menos neste modelo experimental a formação do exsudato também está ligada a outros mediadores inflamatórios, como a exemplo do aumento na síntese de prostaglandinas. Kawamura e colaboradores (2000), demonstraram que a produção de prostanóides exerce importante função durante a pleurisia induzida pela carragenina (KAWAMURA et al., 2000), e Morikawa e colaboradores

(2003) que observaram uma redução significativa na formação de exsudato em modelo de bolsa de ar induzida pela carragenina em ratos, atribuindo essa redução a habilidade da Rutina em inibir a síntese de prostaglandina E_2 (PGE_2) (MORIKAWA et al., 2003). Além disso, a explicação pode estar na dose de Rutina utilizada nos experimentos para a análise do NOx, visto que estudo desenvolvido por Wang e colaboradores (2012) a rutina demonstrou capacidade em inibir a produção de NO, porém em estudo *in vitro* em cultura de células de neuroblastoma.

Assim como o aumento na síntese e liberação de MPO e ADA, e mediadores como o NO, já é bem estabelecido que em processos inflamatórios, existe também a síntese e liberação de outros importantes sinalizadores inter e intracelulares os quais tem a função principal de amplificar o processo inflamatório, com destaque para as citocinas pró-inflamatórias. Dentre as citocinas pró-inflamatórias, destacam-se o TNF- α e a IL-1 β que possuem papel preponderante em diversas doenças de caráter inflamatório. O TNF- α e a IL-1 β , induzem a produção/liberação de outras citocinas e quimocinas, expressão de moléculas de adesão, angiogênese e mediam efeitos inflamatórios sistêmicos, como a febre, a hipotensão além de promoverem a neutrofilia (FERRANTE, 1992; TINCANI et al., 2007). Em nossos experimentos, o material vegetal estudado apresentou importante efeito inibitório sobre a concentração e a transcrição do RNA de ambas as citocinas estudadas. Um fato a ser destacado é que, o TNF- α e a IL-1 β estão diretamente relacionadas ao aumento da expressão de iNOS pelas células endoteliais e consequente aumento nos níveis de NO (KOBAYASHI, 2010).

Os resultados obtidos no presente estudo apontam que ambos os compostos isolados foram efetivos em diminuir tanto a concentração dessas citocinas quanto a transcrição de seus mRNA, apontando para um controle na produção das referidas citocinas. Corroborando com nossos resultados, em estudo recente, Borges e colaboradores (2014) demonstraram que o extrato hidroalcoólico de outra espécie do gênero *Polygala* (*Polygala sabulosa*) foi capaz de reduzir a concentração de TNF- α e IL-1 β no modelo de peritonite induzida por LPS em ratos (BORGES et al., 2014). Também em estudo semelhante, Kim et al. mostraram que a fração aquosa de *Diospyros kaki*, fonte de compostos polifenólicos como a *P. molluginifolia*, mostrou reduzir a expressão gênica e a secreção de TNF- α e IL-1 β , assim como redução da atividade do NF- κ B em um modelo de inflamação alérgica induzida pelo composto 48/80 em camundongos (KIM et al., 2013a).

Analisando os resultados obtidos com a Iso e a Rut sobre a inibição na síntese e liberação das citocinas, pode-se sugerir que o principal mecanismo

anti-inflamatório da *P. molluginifolia*, poderia ser atribuído a estes compostos, relacionado à capacidade dos mesmos em interferir o processo inflamatório em nível transcricional, ou seja, interferindo nas vias de sinalização intracelular deste processo. Dentre essas vias de sinalização, a via do fator de transcrição nuclear (NF- κ B) é uma das mais importantes na síntese de mediadores pró-inflamatórios, como o T/NF- α e a IL-1 β , bem como para a expressão da iNOS responsável pela produção de NO em grandes concentrações durante os processos inflamatórios (DIAMANT; DIKSTEIN, 2013). Ao avaliar o efeito dos compostos em nível transcricional, verificou-se que ambos foram capazes de diminuir a ativação do fator de transcrição NF- κ B, principal fator de transcrição responsável pela expressão gênica das citocinas estudadas durante o desenvolvimento da resposta inflamatória. Ambos os compostos estudados, mostraram-se capazes de reduzir a fosforilação da p65 nas amostras de tecido pulmonar, passo imprescindível na ativação deste fator.

A ativação da via de sinalização do NF- κ B é fortemente regulada e uma ativação inapropriada dessa via está correlacionada com doenças autoimunes, inflamação e câncer. Nas células que não estão estimuladas, o NF- κ B está ligado ao I κ B, uma proteína inibitória que impede o sinal de localização nuclear e previne o NF- κ B de se ligar ao DNA. Além disso, a subunidade p65 do NF- κ B quando ligada com a I κ B parece mudar de conformação, o que evita a sua ligação ao DNA (NAPETSCHNIG; WU, 2013). Entretanto, quando há um estímulo extracelular, como a ativação de receptores de IL-1 β , a cascata de sinalização do NF- κ B é ativada culminando na ativação da I κ B cinase (IKK), que por sua vez fosforila a I κ B, levando a sua degradação via ubiquitinação. Uma vez livre no citoplasma, o dímero NF- κ B rapidamente migra para o núcleo ativando a transcrição gênica (HUANG et al., 2010). Ademais, uma das subunidades do NF- κ B, a p65 está envolvida com a inibição do promotor da IL-8, que é responsável pela ativação da transcrição nuclear dessa quimiocina. A IL-8 é uma quimiocina importante na regulação de processos inflamatórios agudos, é rapidamente sintetizada e participa no recrutamento e ativação de células inflamatórias de caráter agudo, como os neutrófilos. (NOURBAKSHH et al., 2001; REMICK, 2005; WAN; LENARDO, 2010).

Alguns estudos com outras espécies de *Polygala* apresentaram resultados semelhantes quanto à redução da liberação de citocinas e sobre a ativação do NF- κ B. Cheong e colaboradores (2011), demonstraram que o extrato aquoso da *P. tenuifolia* foi capaz de reduzir a liberação dos mediadores inflamatórios em células isoladas da microglia, como TNF- α e IL-1 β , NO e PGE2, e atribuíram esse efeito a prevenção da ativação do NF- κ B e inibição da

degradação do I κ B (CHEONG et al., 2011). Além disso, Kim e colaboradores (2013) demonstraram que o tenuifosilideo A, um fenilpropanoide derivado da *Polygala tenuifolia*, inibiu a translocação da subunidade p65 do NF- κ B para dentro do núcleo em experimentos *in vitro* com macrófagos estimulados com LPS (KIM et al., 2013b), e um estudo recente utilizando a técnica de QSAR concluiu que as isoflavonas e seus derivados têm a capacidade de reduzir a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B (LEE et al., 2010).

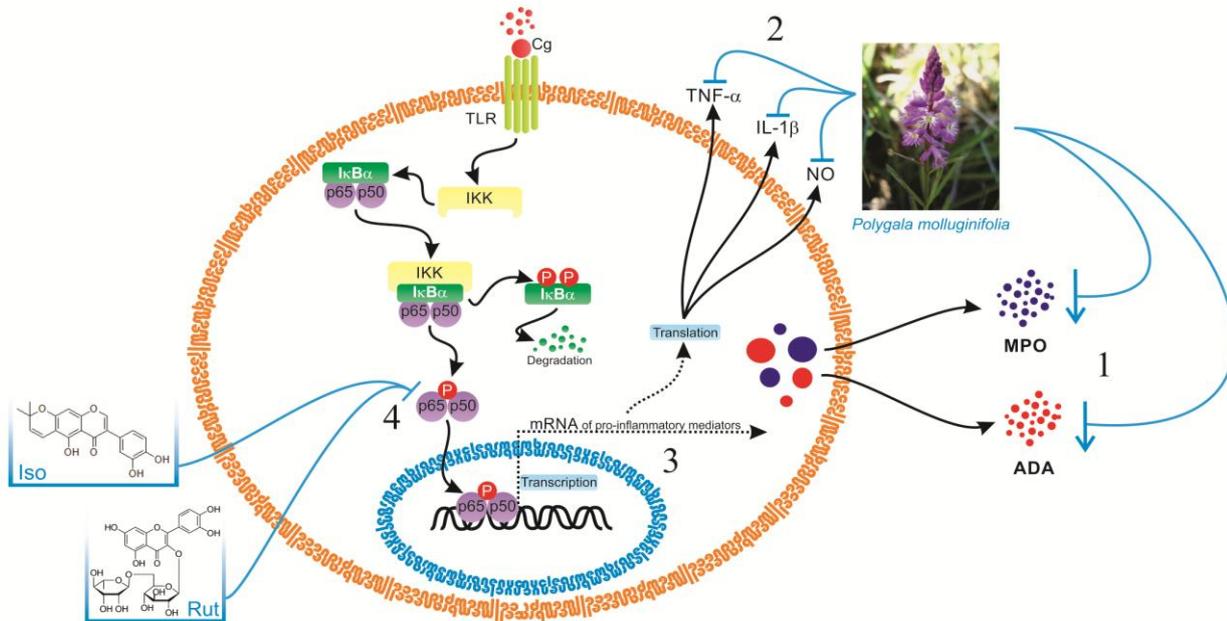
7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o material vegetal obtido da *Polygala molluginifolia* apresenta importante efeito anti-inflamatório, avaliado no modelo *in vivo* de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Este efeito foi observado, pois o EB, as frações Aq, AcOEt e Hex, além dos compostos isolados Iso e Rutina, foram capazes de:

- 1) Reduzir a atividade da MPO e ADA, relacionada à ativação e recrutamento de neutrófilos, além de contribuir para a homeostase da inflamação (**Figura 23, 1**);
- 2) Reduzir os níveis de NOx (exceto a Rutina) (**Figura 23, 2**);
- 3) Diminuir a síntese e as concentrações das citocinas TNF- α e IL-1 β (**Figura 23, 2**)

Portanto, o efeito anti-inflamatório da *P. molluginifolia* pode estar relacionado a grande quantidade dos compostos isolados Iso e Rutina. Além disso, o mecanismo de ação anti-inflamatório parece ocorrer a nível transcripcional, uma vez que os compostos isolados interferem na transcrição nuclear e na via de sinalização do NF- κ B (**Figura 23, 3 e 4**).

Figura 23. Resumo gráfico dos efeitos da *Polygala molluginifolia* sobre os mediadores pró-inflamatórios analisados.



REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 10, p. 1397-421, 2006.

ALTINIER, G. et al. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 5, p. 1718-23, 2007.

ARIBI, M. et al. Relationship between interleukin-1beta and lipids in type 1 diabetic patients. **Med Sci Monit**, v. 13, n. 8, p. Cr372-8, 2007.

ARRUDA-SILVA, F. et al. *Polygala molluginifolia* A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF-kappaB activation. **Int Immunopharmacol**, v. 19, n. 2, p. 334-341, 2014.

ASRES, K. et al. Anti-inflammatory activity of extracts and a saponin isolated from *Melilotus elegans*. **Pharmazie**, v. 60, n. 4, p. 310-2, 2005.

BATRA, S.; BALAMAYOORAN, G.; SAHOO, M. K. Nuclear factor-kappaB: a key regulator in health and disease of lungs. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 59, n. 5, p. 335-51, 2011.

BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **J Pathol**, v. 202, n. 2, p. 145-56, 2004.

BHATTACHARYYA, S. et al. Carrageenan-induced innate immune response is modified by enzymes that hydrolyze distinct galactosidic bonds. **J Nutr Biochem**, v. 21, n. 10, p. 906-13, 2010.

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

BLUMENTHAL, R. **The Complete German Commission E monographs**. New York. 2003.

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

BORTHAKUR, A. et al. Prolongation of carrageenan-induced inflammation in human colonic epithelial cells by activation of an NFkappaB-BCL10 loop. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 8, p. 1300-7, 2012.

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

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

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

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

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

CORSINI, E. et al. Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rats. **Immunology**, v. 115, n. 2, p. 253-61, 2005.

CUZZOCREA, S. et al. Inducible nitric oxide synthase knockout mice exhibit resistance to the multiple organ failure induced by zymosan. **Shock**, v. 16, n. 1, p. 51-8, 2001.

DA ROCHA LAPA, F. 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 Signal**, v. 8, n. 4, p. 693-704, 2012.

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

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935-45, 2008.

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

DALMARCO, E. M.; 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, p. 777-784, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132007000500005&nrm=iso>.

DALMARCO, E. M.; FRODE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflamm**, v. 11, n. 5, p. 299-306, 2002.

DE ARAUJO LOPES, A. et al. Afrormosin, an Isoflavonoid from *Amburana cearensis* A. C. Smith, Modulates the Inflammatory Response of Stimulated Human Neutrophils. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 2013.

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. **J Physiol Biochem**, 2014.

DE CAMPOS, R. O. et al. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (*Polygalaceae*). **Life Sci**, v. 61, n. 16, p. 1619-30, 1997.

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

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 519-50, 2009.

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

FAN, Z. et al. Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage. **Am J Pathol**, v. 171, n. 3, p. 938-46, 2007.

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

FERRANTE, A. Activation of neutrophils by interleukins-1 and -2 and tumor necrosis factors. **Immunol Ser**, v. 57, p. 417-36, 1992.

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

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

FUKUNAGA, J. et al. Comparative study to elucidate the mechanism underlying the difference in airway hyperresponsiveness between two mouse strains. **Int Immunopharmacol**, v. 7, n. 14, p. 1852-61, 2007.

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell**, v. 109 Suppl, p. S81-96, 2002.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Adenosine deaminase: colorimetric method. In: HU, B. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. Verlag Chemie Press, Weinheim, Germany, 1984. p.315-323.

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

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

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

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Aspects Med**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HASKO, G.; SITKOVSKY, M. V.; SZABO, C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 3, p. 152-7, 2004.

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

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. **Mol Cancer**, v. 12, p. 86, 2013.

HUANG, B. et al. Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. **Cell Signal**, v. 22, n. 9, p. 1282-90, 2010.

IMPELLIZZERI, D. et al. CGS 21680, an agonist of the adenosine (A2A) receptor, decreases acute lung inflammation. **Eur J Pharmacol**, v. 668, n. 1-2, p. 305-16, 2011.

JAILLON, S. et al. Neutrophils in innate and adaptive immunity. **Semin Immunopathol**, v. 35, n. 4, p. 377-94, 2013.

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

KAWAMURA, M. et al. Are the anti-inflammatory effects of dexamethasone responsible for inhibition of the induction of enzymes involved in prostanoid formation in rat carrageenin-induced pleurisy? **Eur J Pharmacol**, v. 400, n. 1, p. 127-35, 2000.

KELLEHER, Z. T. et al. NOS2 regulation of NF-kappaB by S-nitrosylation of p65. **J Biol Chem**, v. 282, n. 42, p. 30667-72, 2007.

KIM, H. H. et al. Inhibitory effects of *Diospyros kaki* in a model of allergic inflammation: Role of cAMP, calcium and nuclear factor-kappa B. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 32, n. 4, p. 945-951, 2013a. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000323725200026 >.

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

KIM, K.-S. et al. The inhibition of JNK MAPK and NF-κB signaling by tenuifoliside A isolated from *Polygala tenuifolia* in lipopolysaccharide-induced macrophages is associated with its anti-inflammatory effect. **European Journal of Pharmacology**, v. 721, n. 1-3, p. 267-276, 2013b. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299913006791> >.

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

- KINNE, R. W. et al. Macrophages in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res**, v. 2, n. 3, p. 189-202, 2000.
- KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.
- KLEIN, L. C., JR.; DE ANDRADE, S. F.; CECHINEL FILHO, V. A pharmacognostic approach to the *Polygala* genus: phytochemical and pharmacological aspects. **Chem Biodivers**, v. 9, n. 2, p. 181-209, 2012.
- KLEIN, L. C., JR. et al. Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (*Polygalaceae*). **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 381, n. 2, p. 121-6, 2010.
- KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 88, n. 6, p. 1157-62, 2010.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159-75, 2013.
- KOU, J. et al. Antiinflammatory activity of *Polygala japonica* extract. **Fitoterapia**, v. 77, n. 6, p. 411-5, 2006.
- KUMAR, A. et al. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. **J Mol Med (Berl)**, v. 82, n. 7, p. 434-48, 2004.
- KUMAR, V.; SHARMA, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. **Eur J Pharmacol**, v. 616, n. 1-3, p. 7-15, 2009.

LAPA FDA, R. et al. Gastroprotective activity of the hydroalcoholic extract obtained from *Polygala paniculata* L. in rats. **J Pharm Pharmacol**, v. 59, n. 10, p. 1413-9, 2007.

LAPA FDA, R. et al. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 104, n. 4, p. 306-15, 2009.

LEE, S. et al. Isoflavone derivatives inhibit NF-kappaB-dependent transcriptional activity. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 20, n. 21, p. 6277-81, 2010.

LI, J. et al. Anti-neuroinflammatory constituents from *Polygala tricornis* Gagnep. **Fitoterapia**, v. 83, n. 5, p. 896-900, 2012.

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

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

LUQMAN, S.; PEZZUTO, J. M. NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. **Phytother Res**, v. 24, n. 7, p. 949-63, 2010.

MALAVIYA, A. M. Cytokine network and its manipulation in rheumatoid arthritis. **J Assoc Physicians India**, v. 54 Suppl, p. 15-8, 2006.

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

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

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

MARIOTTO, S. et al. Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 18, p. 1940-4, 2007.

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

MARZOCHELLA, L. et al. Dietary flavonoids: molecular mechanisms of action as anti-inflammatory agents. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov**, v. 5, n. 3, p. 200-20, 2011.

MASILAMANI, M.; WEI, J.; SAMPSON, H. A. Regulation of the immune response by soybean isoflavones. **Immunol Res**, v. 54, n. 1-3, p. 95-110, 2012.

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

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

MERCURIO, F.; MANNING, A. M. NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. **Oncogene**, v. 18, n. 45, p. 6163-71, 1999.

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

MONTAG, C. et al. Human cytomegalovirus blocks tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-mediated NF-kappaB signaling. **J Virol**, v. 80, n. 23, p. 11686-98, 2006.

MOORE, A. R. Pleural models of inflammation: immune and nonimmune. **Methods Mol Biol**, v. 225, p. 123-8, 2003.

MORIKAWA, K. et al. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. **Life Sci**, v. 74, n. 6, p. 709-21, 2003.

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

NAPETSCHNIG, J.; WU, H. Molecular basis of NF-kappaB signaling. **Annu Rev Biophys**, v. 42, p. 443-68, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v. 75, n. 3, p. 311-35, 2012.

NOURBAKHSH, M. et al. The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element. **J Biol Chem**, v. 276, n. 6, p. 4501-8, 2001.

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

OKAMOTO, T. et al. Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 286, n. 1, p. L198-209, 2004.

ORTEGA-GOMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO Mol Med**, v. 5, n. 5, p. 661-74, 2013.

PAIVA, J. A. R. Polygalarum Africanarum et Madagascariensium prodomus atque gerontogaei generis Heterosamara Kuntze, a genere Polygala segregati et a nobis denuo recepti, synopsis monographica. **Frontuaria**, v. 50, p. 1-346, 1998.

PAREDI, P.; BARNES, P. J. The airway vasculature: recent advances and clinical implications. **Thorax**, v. 64, n. 5, p. 444-50, 2009.

PAUL, S. et al. In vitro and in vivo studies demonstrate anticancer property of root extract of *Polygala senega*. **J Acupunct Meridian Stud**, v. 3, n. 3, p. 188-96, 2010.

PELUSO, I.; RAGUZZINI, A.; SERAFINI, M. Effect of flavonoids on circulating levels of TNF-alpha and IL-6 in humans: a systematic review and meta-analysis. **Mol Nutr Food Res**, v. 57, n. 5, p. 784-801, 2013.

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

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 2, p. 331-8, 2004.

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

REDDY, S. V. et al. Leflunomide reduces nitric oxide production in patients with active rheumatoid arthritis. **Int Immunopharmacol**, v. 5, n. 6, p. 1085-90, 2005.

REMICK, D. G. Interleukin-8. **Crit Care Med**, v. 33, n. 12 Suppl, p. S466-7, 2005.

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

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

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **Am J Cardiol**, v. 101, n. 10a, p. 43d-49d, 2008.

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

SCHMATZ, R. et al. Moderate red wine and grape juice consumption modulates the hydrolysis of the adenine nucleotides and decreases platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochem Biophys**, v. 65, n. 2, p. 129-43, 2013.

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

SCHMIDT, B. et al. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism**, v. 57, n. 7 Suppl 1, p. S3-9, 2008.

SEELY, A. J.; PASCUAL, J. L.; CHRISTOU, N. V. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. **Crit Care**, v. 7, n. 4, p. 291-307, 2003.

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

TAKEUCHI, K. et al. Nitric oxide: inhibitory effects on endothelial cell calcium signaling, prostaglandin I₂ production and nitric oxide synthase expression. **Cardiovasc Res**, v. 62, n. 1, p. 194-201, 2004.

THOMAS, S. R.; WITTING, P. K.; DRUMMOND, G. R. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 10, p. 1713-65, 2008.

TINCANI, A. et al. Inflammatory molecules: a target for treatment of systemic autoimmune diseases. **Autoimmun Rev**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2007.

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

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

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

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

TSUCHIYA, K. et al. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4548-56, 2007.

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

VAJDOVICH, P. Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 38, n. 1, p. 31-123, v. 2008.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN LINDEN, A.; ELTZSCHIG, H. K. Role of pulmonary adenosine during hypoxia: extracellular generation, signaling and metabolism by surface adenosine deaminase/CD26. **Expert Opin Biol Ther**, v. 7, n. 9, p. 1437-47, 2007.

VENZKE, D. et al. PAMPA permeability, acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of pyranoisoflavones from *Polygala molluginifolia* (*polygalaceae*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1991-1997, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532013001200013&nrm=iso>.

VON KNETHEN, A.; SOLLER, M.; BRUNE, B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and sepsis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 55, n. 1, p. 19-25, 2007.

WAN, F.; LENARDO, M. J. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. **Cell Res**, v. 20, n. 1, p. 24-33, 2010.

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

WANG, S. W. et al. Rutin inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 482-90, 2012.

WANG, Y. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. **J Ethnopharmacol**, v. 151, n. 2, p. 944-50, 2014.

WILSON, H. M. et al. Inhibition of macrophage nuclear factor-kappaB leads to a dominant anti-inflammatory phenotype that attenuates glomerular inflammation in vivo. **Am J Pathol**, v. 167, n. 1, p. 27-37, 2005.

YOON, E. K. et al. Soybean glyceollins mitigate inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression levels via suppression of the NF-kappaB signaling pathway in RAW 264.7 cells. **Int J Mol Med**, v. 29, n. 4, p. 711-7, 2012.

ZARBOCK, A.; LEY, K. Neutrophil adhesion and activation under flow. **Microcirculation**, v. 16, n. 1, p. 31-42, 2009.

ZHANG, D. et al. Association of IL-1beta gene polymorphism with cachexia from locally advanced gastric cancer. **BMC Cancer**, v. 7, p. 45, 2007a.

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

ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo de aprovação na comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC)
(PP00757)

PP00757

Título

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

Data de Entrada

24/04/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

01/06/2012

Considerações

Ofício nº 44/CEUA/PRPE/2011

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

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

Prezado(a) Professor(a),

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

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

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

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

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

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

Atenciosamente,

Data 05/06/2012

Parecer(es):



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

ANEXO 2

Resumos apresentados em anais de congressos

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

NASCIMENTO, M. V. P. S. ; **ARRUDA-SILVA, F.** ; QUEIROZ, G. S. ; PIZZOLATTI, M. G. ; BRIGHENTE, I. M. C. ; DALMARCO, E. M. . Anti-Inflammatory activities of *Bunchosia armeniaca* (Cav.) DC. (Malpighiaceae). In: 11th World Congress on Inflammation and XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2013, Natal, RN. Immunopharmacology (IP), 2013.

SILVA, F. A. ; ASTOLFI, G. ; LIZ, R. ; CORDOVA, C. M. M. ; FRODE, T. S. ; DALMARCO, E. M. . Modulatory effect of mycophenolate mofetil on carragenan-induced inflammation in the mouse air pouch model. In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia - SP. FeSBE 2012, 2012.

ANEXO 3

Artigo publicado em revista indexada.

Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576914000642>

Polygala molluginifolia A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF- κ B activation



Fábio Arruda-Silva^a, Marcus Vinicius P.S. Nascimento^a, Ana B.G. Luz^a, Dalila Venzke^b, Gustavo S. Queiroz^b, Tânia S. Fröde^a, Moacir G. Pizzolatti^b, Eduardo M. Dalmarco^{a,*}

^a Department of Clinical Analyses, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

^b Department of Chemistry, Centre of Physical and Mathematical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2013

Received in revised form 5 February 2014

Accepted 10 February 2014

Available online 20 February 2014

Keywords:

Polygala molluginifolia

Pleurisy

5,3',4'-trihydroxy-6',6'-dimethylpyrano

[2',3':7,6] isoflavone

Rutin

Carrageenan

Mice

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the anti-inflammatory activity of *Polygala molluginifolia* (Polygalaceae) on the mouse pleurisy model induced by carrageenan. *P. molluginifolia* is a plant native to southern Brazil that is popularly called "canfora". The *Polygala* genus is used to treat different pathologies, including inflammatory diseases, in traditional medicine.

Material and methods: The whole *P. molluginifolia* plant material was extracted by maceration with 96% ethanol. The crude hydroalcoholic extract (CE) was subjected to chromatographic procedures to produce various derivate fractions, including its aqueous (Aq), ethyl acetate (EtOAc), and hexane (Hex) fractions. Compound 1 (5,3',4'-trihydroxy-6',6'-dimethylpyrano [2',3':7,6] isoflavone) (Iso), which was isolated from the EtOAc fraction, and Compound 2 (rutin) (Rut), which was isolated from the Aq fraction, were identified using ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and quantified using an HPLC apparatus.

Results: The CE, the Aq, EtOAc, and Hex fractions, and the isolated compounds Iso and Rut were able to reduce cell migration and exudation. Furthermore, the plant material also decreased the myeloperoxidase (MPO) and adenosine-deaminase (ADA) activities and the nitric oxide (NO_x), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-1 beta (IL-1 β) levels. In addition, Iso and Rut reduced the TNF- α and IL-1 β mRNA expression levels and significantly decreased NF- κ B p65 phosphorylation.

Conclusion: The results show that *P. molluginifolia* has a significant anti-inflammatory action and that this effect is due, at least in part, to the presence of Iso and Rut in large amounts. Moreover, this effect was found to be closely related to the inhibitory effects of the isolated compounds on the NF- κ B pathway.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.