

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
BRUNO MATHEUS DE CAMPOS FACCHIN

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *Calea  
pinnatifida* (R. Br.) Less. NO MODELO DA PLEURISIA  
INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS**

Florianópolis  
2016



Bruno Matheus de Campos Facchin

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA 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, como requisito para a obtenção do título de mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Tânia Silvia Fröde.

Florianópolis  
2016

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

Facchin, Bruno Matheus de Campos  
ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *Calea pinnatifida*  
(R. Br.) Less. NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA  
CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS / Bruno Matheus de Campos  
Facchin ; orientadora, Tânia Sílvia Fróde - Florianópolis,  
SC, 2016.  
87 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Pleurisia. 3. Inflamação. 4. *Calea pinnatifida*. 5. Farmácia. I. Fróde, Tânia Sílvia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

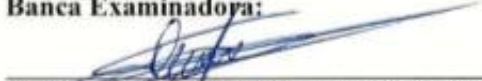
**“ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA  
Calea pinnatifida (R. Br.) Less. NO MODELO DA  
PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM  
CAMUNDONGOS”**

**POR**

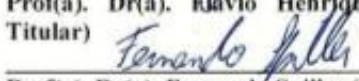
**Bruno Matheus de Campos Facchin**


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


**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Alexandre Sherley Casimiro Onofre (UFSC –  
Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Flávio Henrique Reginatto (UFSC – Membro  
Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Fernando Spiller (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Tânia Silvia Fróde (UFSC – Orientador(a))

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

Florianópolis, 29 de março de 2016.



## AGRADECIMENTOS

*Agradeço inicialmente à minha família, meus queridos pais e meu irmão, que em todos os momentos de dificuldade e desafios foram minha fortaleza e inspiração para seguir em frente e não desistir dos meus sonhos. Sou grato por toda a dedicação em minha educação e por terem sido meus exemplos de perseverança e humildade. Ficarei eternamente em dívida com vocês por terem me guiado para hoje eu ser quem sou, obrigado por tudo o que fizeram e fazem até hoje por mim, amo vocês.*

*À minha amiga, companheira, parceira, namorada e também mestranda Ana Beatriz, que esteve ao meu lado em toda essa caminhada, partilhando das mesmas dificuldades, alegrias e tristezas, que me tranquilizou até mesmo nos momentos em que tudo parecia desmoronar. Sentirei saudades de partilhar momentos de trabalho ao lado de uma pessoa tão especial e dedicada. Serei sempre um grande homem enquanto tiver uma grande mulher como você pra me iluminar.*

*Á todos os meus amigos de faculdade, que me proporcionaram anos inesquecíveis, de muito estudo, diversão e noites em claro por conta de provas ou festas. Junto com vocês me tornei uma pessoa melhor e mais preparada. Aos meus colegas do grupo de pesquisa, Marcus Vinicius, Rodrigo Mattei, Geison Vicente, Antônio Munhoz, Renata Rodrigues, Patrícia Pozzatti, Ziliani Buss, Rafael de Liz, Fábio Arruda, Yeo Jim, Julia Salvan, e Silvana Vigil, agradeço pelos momentos de dificuldade partilhados e por todo o conhecimento que de certa forma cada um de vocês trouxe para a minha formação, estarei à disposição de todos a qualquer momento para tudo que precisarem.*

*Á professora Maique Biavatti, e sua aluna de Doutorado, Tamires Cardoso, por fornecerem todo o material vegetal utilizado para a realização desse trabalho e pela parceria durante todo esse período.*

*Á professora Tânia Silvia Fröde, por ter me dado a oportunidade de pertencer ao seu grupo de pesquisa e por todos esses anos de trabalhos desenvolvidos juntos, desde meu período de iniciação científica até o mestrado. Serei eternamente grato pela confiança e por ter ajudado a consolidar meus conhecimentos, tanto acadêmicos quanto profissionais.*

*Parte da minha excelente formação com certeza se deve a sua imensa dedicação comigo e com todos seus alunos.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia e todo seu corpo docente, agradeço pelo apoio e conhecimentos compartilhados.*

*Por fim, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração desse trabalho e por terem acreditado em mim desde o início. Espero poder retribuir para a sociedade tudo o que aprendi e partilhei com tantas pessoas incríveis.*

**MUITO OBRIGADO!**



O segredo da criatividade está em dormir bem e abrir a mente para as possibilidades infinitas. O que é um homem sem sonhos?

*(Albert Einstein)*



## RESUMO

**Introdução:** O gênero *Calea* pertence à família Asteraceae e contém cerca de 125 espécies, distribuídas mundialmente em áreas tropicais e subtropicais, sendo que o maior número dessas espécies é registrado no Brasil. Espécies do gênero *Calea* são popularmente utilizadas para o tratamento de reumatismo, doenças respiratórias e, problemas digestivos. A *Calea pinnatifida* (*C. pinnatifida*), popularmente conhecida como “aruca” e “cipó-cruz”, é uma planta perene e subarborescente encontrada principalmente nos estados do sul e sudeste do Brasil, utilizada na medicina popular para o tratamento de dores estomacais, giardíase e amebíase. Embora já existam trabalhos que demonstrem a atividade antiproliferativa e leishmanicida da *C. pinnatifida*, ainda não existem estudos farmacológicos descritos que tenham avaliado sua atividade anti-inflamatória. **Objetivos:** Investigar a atividade anti-inflamatória do extrato bruto, frações e compostos isolados das folhas da *C. pinnatifida*, utilizando um modelo murino de pleurisia induzida pela carragenina. **Metodologia:** As folhas da *C. pinnatifida* foram submetidas a um processo de maceração com etanol 92%, para obtenção do extrato bruto etanólico (EB). O EB foi submetido a uma partição líquido/líquido sob agitação manual de forma exaustiva e sucessiva, utilizando os solventes: hexano, clorofórmio e acetato de etila, respectivamente, para obter as frações hexano (Hex), diclorometano (DCM), e acetato de etila (AcOEt), bem como a fração aquosa remanescente, pelo qual foi obtido a fração metanólica (MeOH), a partir de uma cromatografia em coluna, utilizando da resina Amberlite XAD-4 como fase estacionária e metanol como fase móvel. Os compostos foram isolados a partir da fração acetato por métodos cromatográficos e identificados por meio de dados espectroscópicos de infra-vermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono treze. A pleurisia foi induzida segundo metodologia descrita por SALEH et al., 1996 e os parâmetros inflamatórios como: migração de leucócitos, exsudação, atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-desaminase (ADA), concentrações dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) e das citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-17A (IL-17A), foram avaliados 4 h após a indução da inflamação. Além disso, também avaliou-se a capacidade dos compostos isolados, ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (3,5-diACQ) e ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (4,5-diACQ), em inibir a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e p38 MAPK. Para isso, diferentes grupos de

animais foram tratados com EB (25-100 mg/kg), Hex (5-25 mg/kg), DCM (5-25 mg/kg), MeOH (5-25 mg/kg), AcOEt (2,5-25 mg/kg), 3,5-diACQ (1-5 mg/kg) ou 4,5-diACQ (1-5 mg/kg) administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.). Para avaliar a exsudação, os animais foram tratados previamente com solução de Azul de Evans (25 mg/kg) por via intravenosa (i.v.), 10 min antes da administração de EB, frações e compostos isolados da *C. pinnatifida*. Ensaio colorimétricos foram utilizados para analisar a atividade das enzimas MPO e ADA, bem como NOx. Testes imunoenzimáticos (ELISA) foram realizados, para determinar as concentrações das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A e também para avaliar a fosforilação de p65 (NF- $\kappa$ B) e p38 MAPK. Diferenças estatísticas entre os grupos foram determinados utilizando análise de variância (ANOVA), complementados pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls, valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. **Resultados:** EB (50-100 mg/kg), Hex (10-25 mg/kg), MeOH (10-25 mg/kg), AcOEt (5-25 mg/kg), 3,5-diACQ (2,5-5 mg/kg) e 4,5-diACQ (5 mg/kg) inibiram: leucócitos, neutrófilos e exsudação ( $p < 0,05$ ). EB (50 mg/kg), Hex (10 mg/kg), MeOH (10 mg/kg), AcOEt (5 mg/kg), 3,5-diACQ (2,5 mg/kg) e 4,5-diACQ (5 mg/kg) inibiram as atividades das enzimas MPO e ADA, as concentrações de NOx e as citocinas IL-1 $\beta$  e IL-17A ( $p < 0,05$ ). EB, AcOEt, 3,5-diACQ e 4,5-diACQ, nas doses citadas acima, diminuíram as concentrações de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ). Os compostos 3,5-diACQ e 4,5-diACQ, também inibiram a fosforilação da p65 e p38 ( $p < 0,05$ ). **Conclusão:** Este estudo demonstrou que a *C. pinnatifida* possui importante atividade anti-inflamatória, inibindo a migração de leucócitos do tipo neutrófilos, bem como a diminuição da exsudação. Esse efeito provavelmente foi devido a diminuição da concentração de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A e NOx) no lavado pleural e esses efeitos parecem estar relacionados em parte, pela capacidade dos compostos isolados em inibir vias intracelulares importantes envolvidas no processo inflamatório, como o NF- $\kappa$ B e p38 MAPK.

**Palavras chave:** *Calea pinnatifida*, inflamação, pleurisia, citocinas, NF- $\kappa$ B, MAPK.

## ABSTRACT

### **Study of anti-inflammatory effects of *Calea pinnatifida* (R.Br.) Less. in a murine model of pleurisy induced by carrageenan.**

**Introduction:** *Calea* genus belongs to the Asteraceae family and contains about 125 species, distributed worldwide in tropical and subtropical areas, with the largest number of these species is registered in Brazil. *Calea* species of the genus are commonly used to treat rheumatism, respiratory diseases, and digestive problems. The *Calea pinnatifida* (*C. pinnatifida*), popularly known as "aruca" and "cipó-cruz", is a perennial and subshrub plant found mainly in the southern and southeastern Brazil states, used in folk medicine to treat stomach aches, giardiasis and amebiasis. Although there are studies that demonstrate the antiproliferative and leishmanicidal activities of *C. pinnatifida*, there are no pharmacological studies to describe its anti-inflammatory activity. **Objectives:** To evaluate the anti-inflammatory activity of crude extract, fractions and isolated compounds from *C. pinnatifida* leaves using a murine model of pleurisy induced by carrageenan. **Methodology:** *C. pinnatifida* leaves were subjected to a maceration process with ethanol 92% to obtain a crude hydroalcoholic extract (CE). CE was subjected to a liquid/liquid partition under manual exhaustive and successively stirring using hexane, chloroform and ethyl acetate eluents, respectively, to obtain the hexane fractions (Hex), dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (EtOAc) as well as the remaining aqueous fraction from which was obtained the methanolic fraction (MeOH), from the use of XAD-4 resin. The compounds were isolated from the EtOAc fraction by chromatographic methods and identified by spectroscopic data of infrared (IR) and nuclear magnetic resonance of hydrogen and carbon thirteen. Pleurisy was induced according to the methodology described by Saleh et al, 1996 and inflammatory parameters such as: Leukocyte migration, exudation, activity of myeloperoxidase (MPO) and adenosine-deaminase (ADA), concentrations of nitric oxide metabolites (NOx) and pro-inflammatory cytokines, tumor necrosis factor-*alpha* (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 *beta* (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-17A (IL-17A) were evaluated 4 hours after inflammation induction. In addition, we also evaluated the ability of the isolated compounds, 3,5-di-*O-E*-caffeoylquinic acid (3,5-diCQA) and 4,5-di-*O-E*-caffeoylquinic (4,5-diCQA) acid to inhibit the phosphorylation of the NF- $\kappa$ B p65 subunit and p38 MAPK. For this, different groups of animals were treated with CE (25-100 mg/kg) Hex (5-

25 mg/kg), DCM (5-25 mg/kg), MeOH (5-25 mg/kg), EtOAc (2.5-25 mg/kg), 3,5-diCQA (1-5 mg/kg) and 4,5-diCQA (1-5 mg/kg) administered by intraperitoneally route (i.p.) 0.5 h before carrageenan (1%) administered by intrapleural route (i.pl.). To evaluate the exudation, the animals were pretreated with Evans blue solution (25 mg/kg) administered by intravenous (i.v.) route. Colorimetric assays were used to analyze the MPO and ADA activities, as well as NO<sub>x</sub> and immunoenzymatic assays (ELISA) to determine the TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17A concentrations and also to evaluate the phosphorylation of p65 (NF- $\kappa$ B) and p38 MAPK. The significant differences between groups were determined using analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls post hoc test and the values of  $p < 0.05$  were considered significant. **Results:** CE (50-100 mg/kg), Hex (10-25 mg/kg), MeOH (10-25 mg/kg), EtOAc (5-25 mg/kg), 3,5-diCQA (2.5- 5 mg/kg) and 4,5-diCQA (5 mg/kg) inhibited: leukocytes, neutrophils, and exudation ( $p < 0.05$ ). CE (50 mg/kg), Hex (10 mg/kg), MeOH (10 mg/kg), EtOAc (5 mg/kg), 3,5-diCQA (2.5 mg/kg) and 4,5-diCQA (5 mg/kg) inhibited the MPO and ADA activities, NO<sub>x</sub>, IL-1 $\beta$  and IL-17A concentrations ( $p < 0.05$ ). At the same dose, only CE, EtOAc, 3,5-diCQA and 4,5-diCQA were able to decrease TNF- $\alpha$  concentrations ( $p < 0.05$ ). The compounds 3,5-diCQA and 4,5-diCQA also inhibited phosphorylation of p65 and p38 ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** This study demonstrated that *C. pinnatifida* has an important anti-inflammatory activity by inhibiting leukocyte migration, neutrophils and decreased exudation. This effect may be occurred by decrease of the concentration of pro-inflammatory mediators (NO<sub>x</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17A) in pleural leakage and these effects appear to be related in part to the ability of the isolated compounds to inhibit important cellular pathways involved in inflammatory process, such NF- $\kappa$ B and p38 MAPK.

**Keywords:** *Calea pinnatifida*, inflammation, pleurisy, cytokines, NF- $\kappa$ B, MAPK.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ativação da via do NF- $\kappa$ B e p38 MAPK em leucócitos.....	36
Figura 2 – Perfil de resposta inflamatória utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	39
Figura 3 – Via do ácido araquidônico e mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs).....	41
Figura 4 – Vias de sinalização genômica e não-genômica dos glicocorticoides em células T.....	42
Figura 5 – Extração do material vegetal da <i>Calea pinnatifida</i> .....	48
Figura 6 – Modelo e protocolo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	53
Figura 7 – Cromatogramas de íons totais no modo negativo (HRESIMS) do extrato bruto, fração acetato de etila, fração metanólica e fração diclorometano.....	60
Figura 8 – Estruturas químicas dos compostos isolados da <i>Calea pinnatifida</i> Less.....	61
Figura 9 – Efeito do extrato bruto da <i>Calea pinnatifida</i> Less. sobre a migração de leucócitos, migração de neutrófilos e exsudação.....	64
Figura 10 - Efeito da fração hexano da <i>Calea pinnatifida</i> Less. sobre a migração de leucócitos, migração de neutrófilos e exsudação.....	65
Figura 11 - Efeito da fração metanólica da <i>Calea pinnatifida</i> Less. sobre a migração de leucócitos, migração de neutrófilos e exsudação.....	66
Figura 12 - Efeito da fração acetato de etila da <i>Calea pinnatifida</i> Less. sobre a migração de leucócitos, migração de neutrófilos e exsudação.....	67
Figura 13- Efeito do ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoil quínico (3,5-diACQ) sobre a migração de leucócitos, migração de neutrófilos e exsudação.....	68

Figura 14 - Efeito do ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoil quinico (4,5-diACQ) sobre a migração de leucócitos, migração de neutrófilos e exsudação.....	69
Figura 15 – Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Calea pinnatifida</i> Less. sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	70
Figura 16 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Calea pinnatifida</i> Less. sobre a atividade da adenosina-desaminase (ADA).....	71
Figura 17 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Calea pinnatifida</i> Less. sobre as concentrações de nitrato/nitrito (NOx).....	72
Figura 18 – Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Calea pinnatifida</i> Less. sobre as concentrações de TNF- $\alpha$ .....	74
Figura 19 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Calea pinnatifida</i> Less. sobre as concentrações de IL-1 $\beta$ .....	75
Figura 20 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Calea pinnatifida</i> Less. sobre as concentrações de IL-17A.....	76
Figura 21 – Efeito dos compostos isolados ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoil quinico (3,5-diACQ) e ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoil quinico (4,5-diACQ), sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e p38 MAPK.....	77
Figura 22 – Resumo dos efeitos da <i>Calea pinnatifida</i> (R.Br) Less. sobre os mediadores inflamatórios estudados.....	85



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR – Receptor de adenosina  
ACN - Acetonitrila  
AcOEt – Fração Acetato de etila da *Calea pinnatifida*  
ADA – Adenosina-desaminase  
AINEs – Anti-inflamatórios não-esteroidais  
AMP – Monofosfato de adenosina  
AQ – Fração aquosa da *Calea pinnatifida*  
ATF1/2 - Fatores de transcrição dependentes de AMP  
AP-1 – Proteína ativadora 1  
BAFF – Fator ativador de células B  
CC – Cromatografia em coluna  
Cg – Carragenina  
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência  
COX2 – Cicloxigenase 2  
CREB - Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc  
c-Rel - Monômero do NF-κB (subunidade)  
DAD – Detector de arranjos de diodos  
DCM – Fração diclorometano da *Calea pinnatifida*  
Dexa - dexametasona  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica  
EB – Extrato bruto da *Calea pinnatifida*  
ERNs – Espécies reativas de nitrogênio  
EROs - Espécies reativas de oxigênio  
GC – Glicocorticoides  
GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos  
GR – Receptores de glicocorticoides  
GRE – Elementos de resposta aos glicocorticoides  
Hex – Fração hexano da *Calea pinnatifida*  
HIV-1 – Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1  
HMBC - *Heteronuclear multiple bond correlation*  
HRESIMS - Espectrometria de massas de alta resolução  
HSQC - *Heteronuclear single quantum coherence*  
Hsp-27 – Proteína *Heat shock* – 27  
IgE – imunoglobulina E  
i.p –intra-peritoneal  
i.pl –intra-pleural  
i.v – intra-venosa  
Indo - indometacina

I $\kappa$ B - Subunidade inibitória do NF- $\kappa$ B  
IKK - Proteína inibitória *kappa* B quinase  
IL- Interleucina  
LPS - Lipopolissacarídeo  
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno  
MEF2 - Fator otimizador de miócitos 2  
MeOH – Fração metanólica da *Calea pinnatifida*  
MKK3 - Proteína quinase dupla induzida por mitógeno  
MKP-1 - Proteína quinase fosfatase-1 ativada por mitógenos  
MNK1 - Quinase interativa com MAPKs  
MPO – Mieloperoxidase  
MSK – Proteína quinase ativada por mitógeno e stress  
NF- $\kappa$ B - Fator de transcrição nuclear *kappa*-B  
NLRP3 - Domínio de repetição rica em leucina contendo proteína 3  
NO – Óxido nítrico  
NOS – Óxido nítrico sintase  
NO<sub>2</sub> - Nitrito  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Nitrato  
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial  
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida  
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal  
OVA – ovalbumina  
p38 - Quinase p38 (MAPK)  
p50/p52/p65/p100 – Subunidades do fator nuclear  $\kappa$ B  
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos  
PG – Prostaglandina  
PGI<sub>2</sub> – Prostaciclina  
PMNs – Polimorfonucleares  
RANK - Ativador de receptor de NF- $\kappa$ B  
RAW 264.7 – Linhagem celular murina  
RelB – Subunidade (RelB) do fator nuclear NF- $\kappa$ B  
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro  
Sal - Salina  
SAPK – Proteínas quinase ativadas por stress  
TAK1 - Quinase 1 ativada por Fator de crescimento transformador *beta*  
TGF $\beta$  - Fator de crescimento transformador *beta*  
Th – Linfócitos T auxiliares  
Tregs – Linfócitos T regulatórios  
TLR – Receptor toll-like  
TNF – Fator de necrose tumoral  
TNFR – Receptores de fator de necrose tumoral

TPA - 12-O-tetra-decanoilforbol-13-acetato

TXA2 – Tromboxano A2

UHPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência

UV – Ultravioleta

VSR – Vírus sincicial respiratório



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1 PLANTAS MEDICINAIS .....	25
1.2 GÊNERO <i>CALEA</i> .....	26
1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	28
1.3.1 CÉLULAS E ENZIMAS QUE PARTICIPAM DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA .....	28
1.3.2 ÓXIDO NÍTRICO.....	30
1.3.3 CITOCINAS .....	31
1.3.4 FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) E PROTEÍNAS QUINASE ATIVADAS POR MITÓGENO (MAPK) ...	34
1.4. MODELOS DE INFLAMAÇÃO.....	37
1.5 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS .....	39
1.6 HIPOTESE.....	43
2.1 OBJETIVO GERAL .....	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	47
3.1.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	47
3.1.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS .....	47
3.1.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO: UHPLC-DAD-HRESIMS) .....	49
3.1.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS .....	49
3.2 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....	50
3.2.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	50
3.2.2 ANIMAIS.....	50

3.2.3 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO .....	51
3.2.4 PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS .....	51
3.2.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	52
3.3 TÉCNICAS UTILIZADAS .....	54
3.3.1 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS ...	54
3.3.2 QUANTIFICAÇÃO DO EXSUDATO PLEURAL.....	54
3.3.4 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADENOSINA-DESAMINASE (ADA) .....	55
3.3.6 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ E IL-17A.....	56
3.3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS .....	57
3.3.9 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA p38 FOSFORILADA .....	58
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	58
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA .....	59
4.2 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>C. pinnatifida</i> SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS, NEUTRÓFILOS E A EXSUDAÇÃO.....	62
4.3 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>C. pinnatifida</i> SOBRE A ATIVIDADE MIELOPEROXIDASE (MPO).....	70
4.4 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>C. pinnatifida</i> SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA-DESAMINASE (ADA).....	71
4.5 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>C. pinnatifida</i> SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO (NO $_x$ ).....	72
4.6 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>C. pinnatifida</i> SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ E IL-17A.....	73
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>

<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICE – Trabalhos desenvolvidos .....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO – Trabalhos em parceria .....</b>	<b>109</b>





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Ao longo dos séculos os seres humanos têm contado com a utilização de plantas medicinais para atender suas necessidades básicas de saúde. As plantas, são amplamente utilizadas no sistema de medicina popular, com os primeiros registros datados de 2600 a.C., documentando o uso de cerca de 1000 substâncias derivadas de plantas na Mesopotâmia para o tratamento de diversas enfermidades (CRAGG; NEWMAN, 2013).

De acordo com a organização Mundial da Saúde (OMS) a medicina popular é a soma dos conhecimentos, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências inclusive indígenas de diferentes culturas, sendo explicáveis ou não, usadas na manutenção da saúde, bem como na prevenção, diagnóstico, melhoria ou no tratamento de doenças. As plantas medicinais, ou ervas medicinais, pertencem a um grupo de terapias baseadas no conhecimento, prática e experiência popular. Com o passar dos anos, a utilização das mesmas na medicina popular vem expandindo globalmente, tornando-se essencial não só em países que dependem de terapias menos custosas mas também em países onde a medicina convencional é predominante no sistema nacional de saúde local (OMS, 2000).

Os países latino-americanos possuem grande biodiversidade mundial. Dentre eles, o Brasil destaca-se por possuir em seu território aproximadamente 20 a 22% do total de todas as plantas superiores existentes no planeta, contando com mais de 50 mil espécies descritas (CALIXTO, 2005). Ao longo das últimas décadas a pesquisa sobre produtos naturais, principalmente sobre as plantas, progrediram rapidamente. Igualmente, a colaboração entre universidades e empresas farmacêuticas locais do Brasil também cresceu, com o intuito de produzir novos medicamentos com segurança, qualidade e eficácia. Essa interação entre a indústria farmacêutica e as universidades, por sua vez estimulou o aparecimento de estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos bem controlados e randomizados (CALIXTO, 2005). Com isso, o Brasil se torna o país com maior biodiversidade mundial, que associada a uma rica diversidade étnica e cultural detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tendo o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas que resultem em novas terapias. Por esse motivo, e sobretudo pela tradição do uso das plantas medicinais, o interesse pelos estudos das propriedades medicinais das plantas e seus

princípios ativos, vem sendo extensivamente explorado pelos pesquisadores brasileiros e mais recentemente, pela indústria farmacêutica, interessada em desenvolver novos medicamentos (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).

Nos dias atuais, estima-se que os gastos globais na área de pesquisa médica giram em torno de US\$ 110 bilhões por ano. Apesar disso, cerca de 90% de todo esse investimento é destinado a problemas de saúde de apenas 10% da população mundial. Em 2003, por exemplo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) observou que menos de 1% de todas as novas drogas aprovadas nos 25 anos anteriores foram desenvolvidas para o tratamento de doenças de países subdesenvolvidos. Além disso, a verdadeira inovação no desenvolvimento de novos fármacos também é controversa. Isso é observado em estudos realizados no Canadá, Estados Unidos e França, que mostraram que cerca de 75% dos medicamentos aprovados para a utilização em humanos não mostrou nenhum tipo de benefício terapêutico (CORDELL; COLVARD, 2012).

Nesse cenário, os laboratórios de pesquisa em plantas medicinais têm como objetivo, a partir de estudos etnofarmacológicos e da medicina tradicional, selecionar espécies a serem estudadas, com o intuito de descobrir substâncias bioativas que sejam possíveis candidatas a ensaios pré-clínicos e clínicos, fornecendo assim, uma base científica à medicina popular na obtenção de novas estruturas químicas de interesse para a indústria farmacêutica, com atividades farmacológicas específicas, podendo resultar em novos fármacos/fitoterápicos (LEE, 2010; ATANASOV et al., 2015)

## 1.2 GÊNERO *CALEA*

O gênero *Calea* pertence à família Asteraceae e contém cerca de 125 espécies, distribuídas mundialmente em áreas tropicais e subtropicais, sendo que, o maior número dessas espécies é registrado no Brasil (ROQUE; CARVALHO, 2011). Na flora brasileira, são encontradas cerca de 80 espécies do gênero *Calea*, que estão distribuídas em todas as regiões do país (MONDIN; BRINGEL; ROQUE, 2013). O estudo dessas espécies tem sido realizado em diferentes linhas de pesquisa, buscando elucidar as propriedades farmacológicas de seus componentes majoritários, tais como: lactonas sesquiterpênicas, acetofenonas, derivados do timol, cromenos e flavonóides. (BOHLMANN et al., 1981; OBER; URBATSCH; FISCHER, 1985; MALDONADO; MARQUEZ; ORTEGA, 1992; STEINBECK et al., 1997; DO NASCIMENTO et al., 2007).

Espécies do gênero *Calea* são popularmente utilizadas para o tratamento de problemas digestivos e estudos têm demonstrado diversas atividades biológicas dessas plantas (FARAGO et al., 2006). Alguns estudos, demonstraram atividades anti-parasitária *in vitro* e hipoglicemiante *in vivo* utilizando a espécie *C. zacatechichi* Schldl (ROMÁN RAMOS et al., 1992; KÖHLER et al., 2002; WU et al., 2011) e também atividade anti-hipertensiva e vasodilatadora da *Calea glomerata* Klatt *in vivo* (GUERRERO et al., 2002). Além disso, o extrato e compostos isolados obtidos das folhas da espécie *C. prunifolia* Hunth, foram utilizados para um estudo que demonstrou o efeito anti-inflamatório farmacológico dessa espécie no modelo de inflamação induzido por 12-O-tetra-decanoilforbol-13-acetato (TPA), em orelha de camundongos (GÓMEZ; GIL, 2011). Já Segura-Cobos e colaboradores (2010), verificaram o efeito anti-nociceptivo e anti-inflamatório do extrato bruto e frações da *Calea zacatechichi* no modelo de edema de pata induzido por carragenina, em ratos. Somado a todos esses achados, podemos ainda citar alguns efeitos biológicos relacionados a compostos isolados a partir de espécies pertencentes ao gênero *Calea*, como: antifúngica e genotóxica (FLACH et al., 2002; FERRAZ et al., 2009), e ainda o efeito inibitório na diferenciação de adipócitos (LINUMA et al., 2003) e atividade acaricida (RIBEIRO et al., 2008), ambos *in vitro*.

A *Calea pinnatifida* (R.Br.) Less. (*C. pinnatifida*) é uma planta perene e subarbustiva, encontrada principalmente nos estados do Distrito Federal, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, onde é conhecida popularmente como: “aruca” e “cipó-cruz” (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000; MONDIN; BRINGEL; ROQUE, 2013).

A atividade leishmanicida de cromenos isolados das folhas dessa planta já foram testados utilizando culturas das formas amastigotas de *Leishmania amazonenses* (LIMA et al., 2015a). Já Marchetti e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antiproliferativa do extrato bruto diclorometano da *C. pinnatifida*, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* com diferentes linhagens de células tumorais humanas, mostrando a capacidade dessa planta em atuar diretamente em vias que estão relacionadas tanto com o desenvolvimento quanto com a progressão de tumores, ambos diretamente relacionados com o processo inflamatório. Em relação à *C. pinnatifida*, ainda não há estudos farmacológicos descritos que tenham avaliado sua atividade anti-inflamatória.

### 1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação consiste em uma série de eventos envolvendo o sistema imunológico e vascular, podendo ser desencadeada por lesão tecidual ou estímulos antigênicos, na tentativa de defender o hospedeiro contra possíveis agentes nocivos. Esta resposta envolve uma cascata de eventos caracterizados por vias de ativação e modulação celular que dependem do tipo de agente lesivo e do estímulo gerado. A inflamação pode estar associada a várias doenças de origem infecciosa ou relacionada a ativação do sistema imunológico (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; NEWTON; DIXIT, 2012). Quando o processo inflamatório não é interrompido com êxito, ocorre a progressão da lesão tecidual, isso se deve à ativação celular exacerbada e a produção de mediadores inflamatórios, com posterior perda da atividade funcional do tecido afetado (DORWARD et al., 2012).

As características clínicas do processo inflamatório já foram descritos há mais de 2000 anos por Celsus e estão bem estabelecidas pelos sinais cardinais clássicos, como: dor, calor, rubor, edema e perda de função (DORWARD et al., 2012). Na cascata de reações que inicia a inflamação observa-se inicialmente uma resposta de fase aguda, que possui duração variável, com vasodilatação local e aumento da permeabilidade microvascular, em capilares e vênulas, seguido pela adesão e infiltração de leucócitos do tipo polimorfonucleares (PMNs) e mononucleares no tecido lesionado, que são atraídos pela ação de diferentes mediadores com a função de quimiotaxia. Por fim, ocorre a fase de resolução da inflamação, pelo qual acontece a regeneração tecidual e fibrose (MEDZHITOV, 2008; LANGER; CHAVAKIS, 2009; MEDZHITOV; HORNG, 2009).

Durante a inflamação, células do sistema imune são recrutadas para o local da lesão, com o objetivo de eliminar microorganismos e restos celulares. Dentre elas, podemos destacar os neutrófilos e as células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

#### 1.3.1 CÉLULAS E ENZIMAS QUE PARTICIPAM DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Os neutrófilos possuem um papel fundamental na resposta imune inata, sendo recrutados rapidamente para o local de lesão tecidual, participando não só no combate a agentes lesivos, mas também no

processo de reparo. As funções desse tipo celular contra microrganismos ocorre a partir da liberação de enzimas e proteínas granulares, bem como a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BRUIJNZEEL; UDDIN; KOENDERMAN, 2015). O recrutamento e a função adequada dessas células são cruciais para a remoção eficiente dos agentes lesivos, contribuindo para o processo normal de cicatrização (HOSTETTER, 2012; EBAID, 2014).

Os neutrófilos possuem em seu citoplasma grânulos primários (azurófilos), secundários (específicos) e terciários (gelatinase), além de vesículas secretoras. Nos grânulos primários, a enzima mieloperoxidase (MPO) destaca-se como um dos principais componentes do sistema microbicida dos neutrófilos (BORREGAARD, 2010; HOSTETTER, 2012). A MPO é uma enzima expressa abundantemente em neutrófilos e, em menor grau, em monócitos, que está diretamente relacionada com a atividade fagocítica dessas células devido a sua atividade bactericida (OLZA et al., 2012). Essa enzima tem papel central na defesa do organismo, por catalisar a reação entre peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e cloreto para formar o ácido hipocloroso (HClO), um composto com ação antimicrobiana e importante durante a resposta imune inata (CHAVALI et al., 2015). Apesar disso, na exacerbação do processo inflamatório, a MPO também é liberada no espaço extracelular, produzindo espécies reativas de oxigênio, que por sua vez, podem causar reações de oxidação em lipídeos, ácido desoxirribonucleico (DNA) e em lipoproteínas, podendo ocasionar dano tecidual (DELPORTE et al., 2013; CHAVALI et al., 2015)

A avaliação da atividade da MPO é uma ferramenta útil para a avaliação indireta da presença de neutrófilos ativados no sítio inflamatório, sendo que esta enzima pode ser encontrada em enfermidades respiratórias graves como a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (MAK, 2008; MONTESEIRÍN, 2009).

Outras células importantes do sistema imune são os monócitos/macrófagos. Macrófagos são células fagocíticas encontradas em todos os tecidos e são formados a partir da diferenciação de monócitos após migrarem para o tecido. Os macrófagos são parte do sistema imune inato e são a linha de frente na defesa do organismo contra patógenos, mas também têm um papel importante na imunidade adaptativa, estimulando as células do sistema imunológico a responder contra agentes lesivos. Essas células são consideradas críticas em controlar e regular o microambiente local dos tecidos, incluindo a coordenação das funções específicas de células residentes, tais como fibroblastos e as células parenquimatosas. As principais funções dos macrófagos são:

apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação (REVIE; SALAHUDDIN, 2014; EL KASMI; STENMARK, 2015). Essas células, quando ativadas, tem a capacidade de secretar citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, ativar a óxido nítrico sintase (NOS) e aumentar a atividade da adenosina-desaminase (ADA) (ANTONIOLI et al., 2012; MATTILA; THOMAS, 2014).

A ADA é uma enzima de ação catabólica de purinas, que cataliza irreversivelmente a desaminação da desoxiadenosina e adenosina em desoxinosina e inosina, respectivamente (KRENKE; KORCZYŃSKI, 2010).

A adenosina é um mediador endógeno com ação pleiotrópica e desempenha efeitos anti-inflamatórios ou pró-inflamatórios, dependendo do tipo de receptor ativado, da célula envolvida e da sua concentração no sítio inflamatório. A adenosina pode ser liberada a partir de neutrófilos ativados e atuar de modo autócrino ou parácrino durante as respostas inflamatórias, podendo inclusive estimular a atividade fagocítica dessas células. Ou seja, a adenosina representa um fator importante da modulação que coordena a duração e a resolução ou progressão da resposta inflamatória por meio da ativação de quatro receptores específicos: classificados como A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R e A<sub>3</sub>R, os quais são amplamente expressos em várias células do sistema imunológico (ANTONIOLI et al., 2014).

Dessa forma, a atividade da ADA se torna importante na regulação das concentrações extracelulares de adenosina e, conseqüentemente, no controle da estimulação do receptor, desempenhando um papel central na modulação da resposta inflamatória (ANTONIOLI et al., 2012). É importante ressaltar que a atividade dessa enzima encontra-se elevada no lavado pleural de pacientes com tuberculose e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (GOODARZI et al., 2010; LEE, 2015).

### 1.3.2 ÓXIDO NÍTRICO

Além da MPO e ADA, outro mediador que vem recebendo destaque é o óxido nítrico (NO). Este, é um gás solúvel que participa de diversos processos biológicos como a regulação do tônus vascular, inflamação, neurotransmissão e apoptose (LORENC-KOCI; CZARNECKA, 2013; PREDONZANI et al., 2015; VANINI; KASHFI; NATH, 2015). O NO é um vasodilatador importante, produzido principalmente por macrófagos e células endoteliais, e participa da resposta imune inata e/ou específica, devido a sua capacidade de exercer

diferentes efeitos em diversos tipos celulares, inclusive aqueles pertencentes ao sistema imune (PREDONZANI et al., 2015). Esse mediador é liberado a partir da metabolização do aminoácido L-arginina em L-citrulina, em uma reação catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS), que incluem a neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e a induzida (iNOS) (PREDONZANI et al., 2015; TSUTSUI et al., 2015). A forma neuronal e endotelial, são constitutivamente expressas, enquanto a induzida é expressa principalmente em processos inflamatórios, estimulada por toxinas microbianas e citocinas pró inflamatórias. (TSUTSUI et al., 2015; VANINI; KASHFI; NATH, 2015). Além disso, já foi observado que a inibição da iNOS promove uma diminuição da exsudação e formação de edema em modelos murinos de pleurisia e edema de pata induzidos pela carragenina (CUZZOCREA et al., 1998).

Em doenças inflamatórias pulmonares, como asma brônquica e DPOC, ocorre o aumento na atividade da iNOS que promove aumento nas concentrações de NO. Esse, por sua vez, reage com o ânion superóxido ocasionando a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como o peroxinitrito, cuja alta concentração contribui para a lesão tecidual, através do processo de peroxidação lipídica, bem como a geração de danos estruturais a proteínas e ao material genético (PREDONZANI et al., 2015).

### 1.3.3 CITOCINAS

Assim como o NO, as citocinas também são importantes mediadores que desempenham um papel central na modulação do sistema imunológico e na inflamação (NAKAMURA; HAYASHI; KUBOKAWA, 2015). As citocinas são pequenas proteínas (5-140 kDa), secretadas por diversas células em resposta a diferentes estímulos e incluem interleucinas, quimiocinas, interferons, fator de necrose tumoral (TNF) e fatores de crescimento, entre outros (GDEK-MICHALSKA et al., 2013; VENDRELL et al., 2015). Esses mediadores possuem grande importância na modulação da resposta do hospedeiro frente a infecções, processos inflamatórios e doenças de etiologia desconhecida (XU; LI; ZHONG, 2015). A secreção dessas citocinas ocorre principalmente em resposta a ativação de fatores de transcrição como o fator de transcrição nuclear *kappa*-B (NF- $\kappa$ B) (MOHAMMED-ALI; CRUZ; DICKHOUT, 2015).

O Fator de necrose tumoral *alpha* (TNF- $\alpha$ ) é uma importante citocina pró inflamatória, secretada principalmente por macrófagos e

neutrófilos, tendo papel central no desenvolvimento e progressão da resposta inflamatória (BALKWILL, 2006). Patógenos bacterianos e outros estímulos lesivos, induzem a secreção de TNF- $\alpha$  a partir de receptores do tipo toll-like (TLR), o que promove a secreção de diversas citocinas, inclusive o próprio TNF- $\alpha$ , que atua de forma parácrina, em um sistema de retroalimentação positiva, culminando na liberação de outros mediadores como o Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e a Inteleucina-8 (IL-8) (BALKWILL, 2006). O TNF- $\alpha$  exerce seus efeitos após ligar-se a receptores da família do TNF (TNFR), principalmente o TNFR1, desencadeando respostas específicas a partir da ativação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B e proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK). Dentre os efeitos do TNF- $\alpha$ , pode-se destacar sua capacidade de atuar na diferenciação, proliferação, além da sobrevivência celular, devido sua capacidade de suprimir processos apoptóticos (BALKWILL, 2006; ROMAGNY; BETTAIEB, 2015).

Outra citocina pró-inflamatória importante, liberada por macrófagos mediante a processos infecciosos ou lesão celular é a Interleucina-1-*beta* (IL-1 $\beta$ ). A IL-1 $\beta$  atua diretamente sobre diversos tipos de células, quer isoladamente ou em combinação com outras citocinas, para indução e/ou ampliação do processo inflamatório (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; IDRIS; GHAZALI; KOH, 2015). A maioria das células não expressam constitutivamente a IL-1 $\beta$ , que é transcricionalmente regulada pelo NF- $\kappa$ B. Portanto, a maioria dos receptores TLR, após o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), pode ativar a via do NF- $\kappa$ B, induzindo a síntese de pró-IL-1 $\beta$  (LAROOCK; NIZET, 2015). Posteriormente, a secreção de IL-1 $\beta$  requer a ativação intracelular de um complexo de proteínas conhecida como inflamassoma. O inflamassoma mais bem caracterizado é o domínio de repetição rica em leucina contendo proteína 3 (NLRP3), que pode ser ativado por toxinas bacterianas e fúngicas, bem como EROs. Com isso, a pró-caspase-1 é clivada em caspase-1 ativa, que ativa a pró-IL-1 $\beta$ , permitindo a secreção da citocina, que também induz o aumento da expressão de moléculas de adesão, produção de prostaglandinas, e secreção de quimiocinas, promovendo o aumento da quimiotaxia e adesão celular, além de angiogênese (IDRIS; GHAZALI; KOH, 2015; LAROOCK; NIZET, 2015; OZAKI; CAMPBELL; DOYLE, 2015).

Com base na secreção de citocinas, os linfócitos T auxiliares são classificados em 4 subgrupos: T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper



17 (Th17) e T regulatórias (Tregs). As células Th1 produzem principalmente interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que é crucial para a ativação de macrófagos, e estão predominantemente envolvidas na depuração de agentes patogênicos intracelulares. Já as células Th2 são caracterizadas pela produção de interleucina-4, interleucina-5 e interleucina-13 e são importantes no recrutamento de eosinófilos, produção de IgE, e consequente eliminação de agentes patogênicos extracelulares (AZADEGAN-DEHKORDI et al., 2015).

Além das células Th1 e Th2, um novo grupo de células T CD4+ vem sendo amplamente estudadas, conhecidas como Th17. Citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  parecem contribuir para promover a diferenciação dessas células, caracterizadas principalmente pela produção predominante de IL-17A, IL-17F, e IL-22. Essas células tem um papel importante na defesa do hospedeiro contra patógenos específicos e são potentes indutores de autoimunidade e inflamação tecidual. Alguns estudos recentes também sugerem que as células Th17, bem como as citocinas que ela produz, estão envolvidas diretamente no desenvolvimento e progressão da asma (CHANG et al., 2011; MORISHIMA et al., 2013; AZADEGAN-DEHKORDI et al., 2015).

Não menos importante, a Interleucina-17A (IL-17A) também vem ganhando destaque devido a achados que sugerem que essa citocina esteja diretamente envolvida no desenvolvimento de doenças de caráter inflamatório (MIOSSEC; KOLLS, 2012; MORISHIMA et al., 2013). O aumento nas concentrações da IL-17A ou do seu RNA mensageiro (RNAm) foram detectados no escarro (BULLENS et al., 2006), lavado bronco-alveolar (MOLET et al., 2001), tecidos brônquicos (VAZQUEZ-TELLO et al., 2010), células mononucleares e soro (AGACHE et al., 2010; ALBANO et al., 2013) de pacientes com asma. A IL-17A também parece ter um papel chave no aumento da neutrofilia nas vias aéreas e resistência ao tratamento com glicocorticoides de pacientes asmáticos, induzindo o aumento da expressão de IL-8 e do receptor *beta* de glicocorticoides (GR- $\beta$ ) em células epiteliais brônquicas (VAZQUEZ-TELLO et al., 2010; MORISHIMA et al., 2013).

Como contra ponto, as células T regulatórias (Tregs) são extremamente importantes pela sua capacidade de supressão imunológica, desempenhando um papel indispensável na manutenção da homeostase e prevenindo a autoimunidade decorrente da ativação exacerbada do sistema imunológico. Esses efeitos ocorrem principalmente pela capacidade que essas células apresentam em induzir apoptose e secretarem citocinas anti-inflamatórias como Interleucina-10 (IL-10) e Fator de crescimento transformador *beta* (TGF $\beta$ ). Além disso

as células Treg também podem reduzir a ativação de células T e a sua proliferação por meio da produção de adenosina mediada por ectonucleotidases como o ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-1 (CD39) e a ecto-5'-nucleotidase (CD73), marcadores altamente expressos nesse tipo celular (ANTONIOLI et al., 2013; BORSELLINO et al., 2015; NIE et al., 2015).

#### 1.3.4 FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) E PROTEÍNAS QUINASE ATIVADAS POR MITÓGENO (MAPK)

Além de células e mediadores, alguns fatores de transcrição e proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK) estão envolvidos diretamente no processo inflamatório, modulando cascatas de sinalização que promovem diferentes respostas biológicas, como apoptose, sobrevivência, diferenciação, proliferação e/ou migração celular. Dentre os fatores de transcrição, podemos destacar o fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).

A família NF- $\kappa$ B é composto por cinco proteínas, p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), p65 (RelA), e RelB e c-Rel e essas proteínas são expressas no citoplasma de quase todos os tipos de células. A ativação da via do NF- $\kappa$ B na asma e DPOC ocorre em grande parte em resposta a mediadores inflamatórios, tais como a IL-1 e TNF ou induzida pela ativação de receptores Toll-like (TLRs) durante uma exacerbação viral ou bacteriana. Muitas doenças, incluindo câncer, doenças auto-imunes e de caráter inflamatório, estão associadas com a desregulação do NF- $\kappa$ B, sendo que esse fator de transcrição pode ser ativado por meio de duas vias distintas, a via clássica ou canônica, e a alternativa ou não-canônica (HAYDEN; GHOSH, 2014; NOORT; TAK; TAS, 2015; SCHULIGA, 2015).

Essas vias podem ser ativadas por vários estímulos, tais como citocinas, fatores de crescimento, produtos bacterianos e virais (lipopolissacarídeo, dsRNA), raios UV, radiação ionizante, EROs, danos ao DNA e estresse oncogênico nas células (XIA; SHEN; VERMA, 2014).

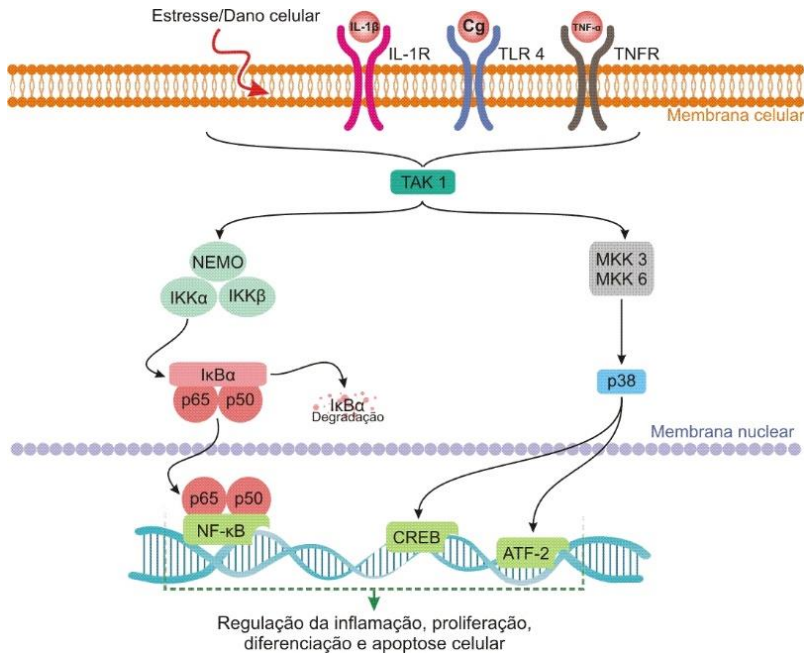
A via de ativação mais extensivamente estudada do NF- $\kappa$ B é a via canônica, que ocorre por meio do estímulo de uma variedade de receptores de membrana celular, incluindo os receptores de TNF, IL-1 e TLRs, em resposta a mediadores pró-inflamatórios (Figura 1). Já a via não-canônica pode ser desencadeada pela ativação dos receptores de TNF a partir de mediadores específicos, como a linfotoxina  $\beta$ , ligante de CD40 (CD40L), fator ativador de células B (BAFF) e o ativador de receptor de

NF- $\kappa$ B (RANK) (NOORT; TAK; TAS, 2015). As duas vias são caracterizadas pela ativação de um complexo de proteínas quinase, conhecidas como proteínas inibitórias *kappa* B quinase (IKKs). Esse complexo consiste em duas subunidades quinase, IKK *alpha* (IKK $\alpha$ ) e IKK *beta* (IKK $\beta$ ), e uma subunidade reguladora, IKK *gamma* (IKK $\gamma$  / NEMO). A atividade desse complexo ocorre através da fosforilação da subunidade inibitória do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), que tem por função regular a via do NF- $\kappa$ B. Membros da família de I $\kappa$ B podem ligar-se aos dímeros do NF- $\kappa$ B no citoplasma e no núcleo inibindo suas respostas transcricionais. Dentre os membros dessa família, podemos destacar principalmente a I $\kappa$ B $\alpha$  e a p100, principais reguladores da via canônica e alternativa respectivamente (LAWRENCE, 2009; HAYDEN; GHOSH, 2014; XIA; SHEN; VERMA, 2014; NOORT; TAK; TAS, 2015). A fosforilação dessas proteínas inibitórias ocorre a partir da ação das IKKs, induzindo a sua degradação proteossômica, permitindo que os dímeros do NF- $\kappa$ B migrem até o núcleo e se liguem ao DNA para induzir a transcrição de genes alvo. Vale ainda ressaltar que a IKK $\beta$  regula a ativação da via canônica, fosforilando I $\kappa$ B $\alpha$  e para esse processo há necessidade da atividade de IKK $\alpha$ . Já a ativação da via alternativa, a partir da fosforilação de p100, ocorre apenas por ação da IKK $\alpha$  (XIA; SHEN; VERMA, 2014; NOORT; TAK; TAS, 2015).

Além de fatores de transcrição, proteínas intracelulares também são importantes na ativação de vias de sinalização, como as MAPK, dentre as quais podemos destacar a proteína p38. A p38 é um importante mediador na resposta inflamatória, especialmente em macrófagos e a sua expressão encontrasse aumentada em resposta a estímulos inflamatórios ou stress, tais como citocinas, radiação ultravioleta, choque osmótico e choque térmico (Figura 1). Além disso, essa proteína está envolvida em processos de autofagia, apoptose e diferenciação celular (YANG et al., 2014).

Existem quatro isoformas de p38 (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  e p38 $\delta$ ), também conhecidas como proteínas quinase ativadas por estresse (SAPK), as quais diferem principalmente pela sua distribuição tecidual (ZARUBIN; HAN, 2005). A ativação dessas proteínas ocorre por meio de uma cascata de fosforilações sequenciais, pelo qual as proteínas MAPK quinases (MKKs), estão envolvidas. Dentre elas, a mais comumente associada com essa via de sinalização é a Proteína quinase dupla induzida por mitógeno 3/6 (MAKK3/6). Uma vez ativada, tanto por estresse quanto por ligantes de receptores de citocinas ou TLRs, essa via tem como consequência a ativação de fatores de transcrição e proteínas intracelulares, como fatores de transcrição dependentes de monofosfato

de adenosina (AMP) (ATF1/2), fator otimizador de miócitos 2 (MEF2), proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), proteína quinase ativada por mitógeno e stress (MSK) e quinase interativa com MAPKs (MNK1), que em macrófagos e neutrófilos, promove o aumento da produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) e enzimas pró-inflamatórias (Ciclooxigenase-2: COX-2 e iNOS), bem como o aumento da expressão de moléculas de adesão em leucócitos (ZARUBIN; HAN, 2005; YANG et al., 2014; LEI et al., 2014).



**Figura 1 – Mecanismo de ativação da via do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) em leucócitos.** ATF-2: Fatores de transcrição dependentes de monofosfato de adenosina; Cg: Carragenina; CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta ao monofosfato cíclico de adenosina; IKK $\alpha$ : Proteína inibitória *kappa* B quinase *alpha*; IKK $\beta$ : Proteína inibitória *kappa* B quinase *beta*; I $\kappa$ B $\alpha$ : Subunidade inibitória do NF- $\kappa$ B *alpha*; IL-1 $\beta$ : Interleucina-1-*beta*; IL-1R: Receptor de interleucina-1; MKK3/6: Proteína quinase dupla induzida por mitógeno 3/6; NEMO: Proteína inibitória *kappa* B quinase *gamma*; NF- $\kappa$ B: fator de transcrição nuclear *kappa*-B; p50: Subunidade (p50) do fator nuclear NF- $\kappa$ B; p65: Subunidade (p65/RelA) do fator nuclear NF- $\kappa$ B; TAK1: Quinase 1 ativada

por Fator de crescimento transformador *beta*; TLR4: Receptor toll-like 4; TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral *alpha*; TNFR: Receptor de TNF.

Devido à importância e por desempenharem papel significativo na resposta inflamatória e outros processos fisiológicos, tanto a via do NF- $\kappa$ B quanto da p38 MAPK tem sido alvos de estudos para o desenvolvimento de drogas que possam ser utilizadas no tratamento de diversas doenças de caráter inflamatório (YANG et al., 2014, MOHAMMED-ALI; CRUZ; DICKHOUT, 2015; NOORT; TAK; TAS, 2015).

#### 1.4. MODELOS DE INFLAMAÇÃO

O campo da imunologia surgiu como uma tentativa de compreender a capacidade natural do corpo em combater infecções e melhorar os métodos para estimular o sistema imune na resistência às doenças infecciosas. No entanto, a fim de poupar pacientes e voluntários humanos de possíveis danos, pesquisadores passaram a utilizar animais em estudos pré-clínicos (WEBB, 2014). Nos dias atuais, grandes centros de pesquisa no mundo discutem melhorias na utilidade e desenho de modelos experimentais de doenças respiratórias, visando adequação dos modelos para que estes possam mimetizar doenças que ocorrem humanos (MERCER et al., 2015).

Para muitos pesquisadores, o uso de modelos experimentais permitem avaliar a eficácia, farmacodinâmica, farmacocinética e toxicidade de novos fármacos. Dentre as espécies utilizadas em modelos *in vivo* que mimetizam doenças envolvendo o sistema respiratório, pode-se destacar: primatas não humanos, cães, porcos, ratos e camundongos, sendo que o uso de camundongos tem sido considerado essencial para elucidar os mecanismos de diversas doenças humanas, incluindo as respiratórias, como a asma (MERCER et al., 2015; TAKAO et al., 2015).

A asma é uma doença predominantemente humana e apenas gatos e cavalos podem desenvolver espontaneamente condições semelhantes. Cerca de 1% dos gatos, e um número indeterminado de cavalos desenvolvem uma resposta alérgica nas vias respiratórias análoga à asma alérgica. A complexidade da condição asmática envolve múltiplos recursos, heterogeneidade com diferentes patologias celulares, fatores genéticos subjacentes, além de componentes ambientais mal identificados e controversos. Dessa forma, torna-se um desafio criar modelos animais que possam capturar uma gama de componentes presentes na asma e mimetizar a condição humana (MULLANE; WILLIAMS, 2014).

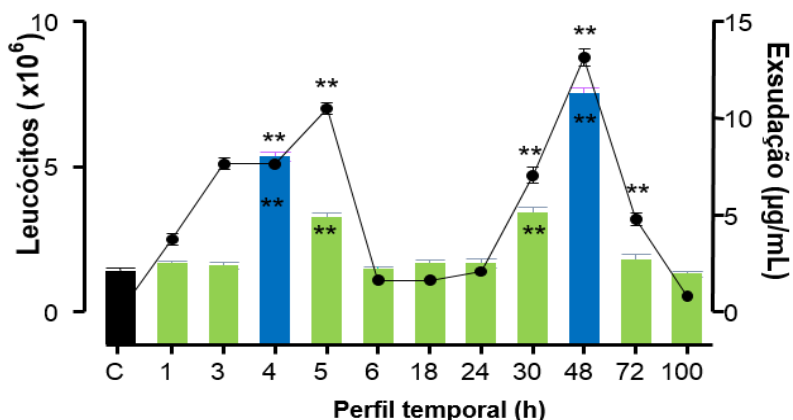
Dentre os modelos desenvolvidos para o estudo de inflamação pulmonar, podemos destacar o modelo de inflamação eosinofílica a partir da utilização de ovalbumina (OVA). Nesse modelo, em um dos protocolos experimentais, os animais (ratos/camundongos) são sensibilizados, no dia 0 e 14 com uma injeção i.p. (20 µg) de OVA. Passados 10 dias da sensibilização, os animais são desafiados por 3 dias consecutivos com OVA por via inalatória. Posteriormente, a análise de parâmetros, como migração celular (eosinófilos e macrófagos) e mediadores inflamatórios, são analisados a partir do lavado bronco-alveolar e tecido pulmonar dos animais, bem como a dosagem de imunoglobulina E (IgE) sérica (FUKUNAGA et al., 2007; MULLANE; WILLIAMS, 2014). No estudo da asma, também são utilizados modelos com partículas virais, levando em consideração que infecções virais em pacientes com asma brônquica ou com DPOC costumam ser mais graves pela exacerbação dos sintomas, além de acontecerem mais comumente (TOURDOT et al., 2008; DULEK; PEEBLES, 2011). Dentre as partículas virais utilizadas para esses modelos, temos como exemplo aquelas pertencentes ao vírus sincicial respiratório (VSR). A combinação da administração de partículas VSR em conjunto com o desafio de animais com OVA, permite avaliar a hiperresponsividade das vias aéreas, exacerbação dos sintomas da doença, além da avaliação da resposta inflamatória local e sistêmica (TOURDOT et al., 2008).

A inflamação neutrofílica das vias aéreas é um componente importante da resposta inflamatória de pacientes com DPOC e alguns fenótipos de asma (SUKKAR et al., 2012).

A pleurisia é um modelo de inflamação neutrofílica, que permite avaliar a resposta inflamatória das vias aéreas na cavidade pleural de camundongos. Para a indução do processo inflamatório nos animais, utiliza-se como agente flogístico a carragenina (Cg). Essa, trata-se de uma substância composta por uma mistura de algas pertencentes a espécie *Chondrus crispus*, conhecida popularmente como musgo-irlandês. O modelo da pleurisia induzida pela Cg é caracterizado por uma resposta inflamatória do tipo bifásica. A primeira fase ocorre após 4 horas e é caracterizada pelo aumento na infiltração de leucócitos na cavidade pleural, principalmente neutrófilos, e também pela formação de exsudato. Já na segunda fase, que ocorre 48 horas após a indução da pleurisia, também observa-se aumento no processo de exsudação e infiltrado de mononucleares (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996) (Figura 2).

Esse modelo tem como característica, mimetizar a resposta inflamatória que ocorre na asma neutrofílica que ocorre em humanos. Além disso, a Cg promove sua ação pró-inflamatória no sistema imune

inato, pela ativação de receptores do tipo Toll 4 (TLR4) e consequente ativação do NF- $\kappa$ B. A Cg também aumenta a produção de EROS, o que promove a redução da concentração da proteína *Heat shock* – 27 (Hsp-27), sendo que baixas concentrações dessa proteína promove a ativação de MAPK como a p38, que também está envolvida diretamente na ativação de NF- $\kappa$ B (BHATTACHARYYA; DUDEJA; TOBACMAN, 2008; BORTHAKUR et al., 2012). Em pacientes asmáticos, a expressão de TLR4 encontra-se aumentada (REYNOLDS, 2007).



**Figura 2 – Perfil da resposta inflamatória utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.** Modelo de resposta inflamatória do tipo bifásica: Na primeira fase (4h) ocorre uma resposta aguda, caracterizada pelo aumento do influxo de neutrófilos pra cavidade pleural, além da formação de exsudato. Na segunda fase (48h), ocorre uma inversão do perfil leucocitário, com aumento de células mononucleares e também com presença de exsudato. Fonte: adaptado de SALEH; CALIXTO e MEDEIROS (1996).

## 1.5 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS

Os fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) representam uma classe de diversos medicamentos com efeito analgésico, anti-inflamatórios e anti-pirético, sendo os fármacos mais utilizados para o tratamento de diversas doenças inflamatórias de caráter crônico, como por exemplo, a osteoartrite e artrite reumatoide (CONAGHAN, 2012). Os efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos dos AINEs são mediados pela sua capacidade de inibir a biossíntese de prostanoídes.

Prostanóides são sintetizados a partir do ácido araquidônico, um ácido graxo presente nas membranas celulares como um éster de fosfolípido. Isoenzimas da Cicloxigenase (COX) convertem o ácido araquidônico a prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) e, em seguida, para Prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), o qual sofre uma série de reações de conversão subsequentes, produzindo cinco prostanoides bioativos, isto é, Prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Prostaglandina F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>), Prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina), e o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (RAO; KNAUS, 2008; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

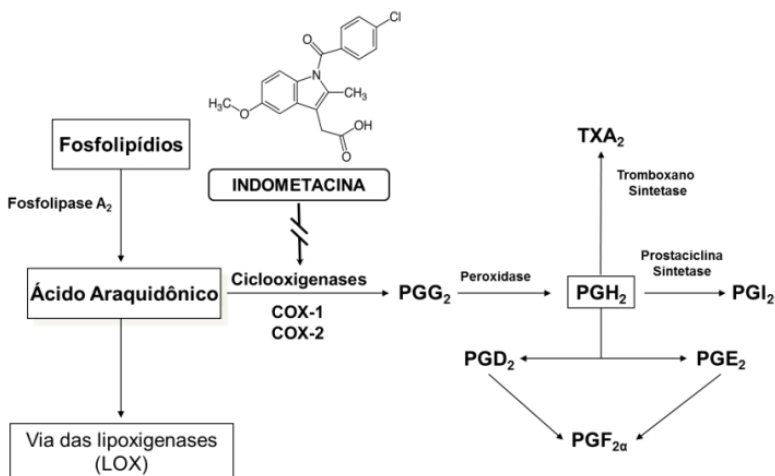
Existem duas isoformas distintas da COX: a COX-1 é a isoforma expressa de forma constitutiva, enquanto a COX-2 é a isoforma induzida. A COX-1 está presente na maioria das células e tecidos, incluindo o endotélio, monócitos, células epiteliais, gastrointestinais, e plaquetas. Em contraste, a COX-2 é expressa constitutivamente em apenas alguns tecidos (RAO; KNAUS, 2008). No entanto, a expressão de COX-2 é regulada em uma variedade de células e tecidos, tais como o endotélio vascular, células endoteliais, sinoviais, monócitos, macrófagos e durante a inflamação através da ação de diversos mediadores inflamatórios como, endotoxinas bacterianas, TNF- $\alpha$  e interleucinas. O aumento da expressão de COX-2 é a principal força motriz para uma maior produção de prostanoides no sítio inflamatório. Embora a COX-2 seja a via primária para a produção de prostanoides, evidências sugerem que a COX-1 é expressa juntamente com a COX-2 em células inflamatórias circulantes e no tecido inflamado (RAO; KNAUS, 2008; SMYTH et al., 2009; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011;).

Os AINEs podem ser classificados ainda como inibidores seletivos ou não-seletivos da COX-2, sendo que a diferença entre eles não está somente na ação, mas também nos efeitos adversos. Dentre os inibidores seletivos da COX-2, podemos citar o meloxicam e o celecoxibe, enquanto como exemplos de inibidores não-seletivos, temos o diclofenaco, o ibuprofeno e a indometacina (CONAGHAN, 2012). Neste estudo, a indometacina foi utilizada como fármaco de referência anti-inflamatório. Na figura 3 é ilustrado a via do ácido araquidônico, bem como o mecanismo de ação anti-inflamatória dos AINEs.

Além dos AINEs, outro grupo de fármacos utilizados para o tratamento de doenças inflamatórias são os anti-inflamatórios esteroidais ou glicocorticoides (GCs). No presente estudo, utilizou-se a dexametasona como fármaco de referência desta classe.

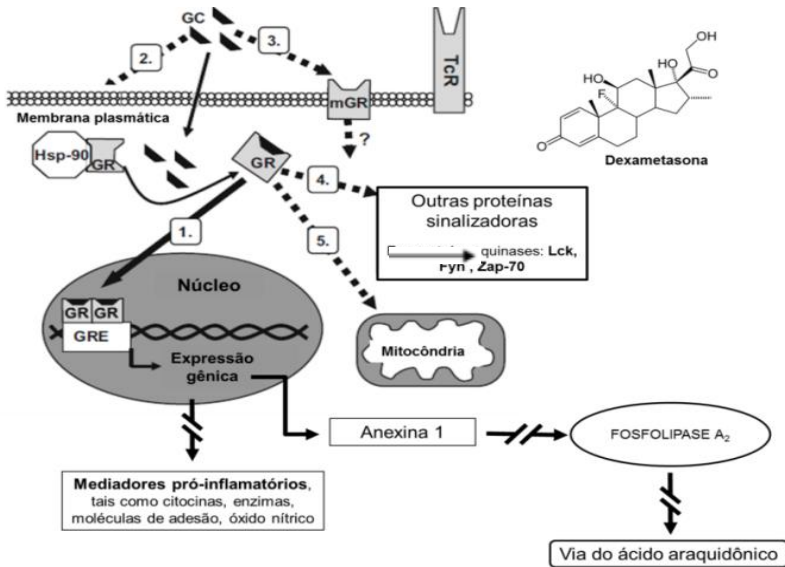


Classicamente, os GC exercem os seus efeitos por meio da ligação aos receptores de glicocorticoides (GR), com posterior translocação do complexo glicocorticoide-receptor até o núcleo. Em seguida, este atua como um fator de transcrição, ligando-se a elementos de resposta aos glicocorticoides (GRE) na região promotora de vários genes alvo, com consequente produção de mediadores com funções anti-inflamatórias, como a interleucina-10, receptor  $\beta$ -adrenérgico, antagonista do receptor de interleucina-1, anexina 1 e I $\kappa$ B $\alpha$ . Ainda, este é capaz de aumentar também a expressão gênica da proteína quinase fosfatase-1 ativada por mitógenos (MKP-1), a qual inibe a via das MAPK, (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; BOLDIZSAR et al., 2010). Além disso, a ativação de GR também é responsável pelo efeito imunomodulatório dos glicocorticoides através da transrepressão, impedindo a transcrição de genes alvo por fatores de transcrição essenciais no processo inflamatório, como o NF- $\kappa$ B e proteína ativadora 1 (AP-1), que promovem a síntese do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, moléculas de adesão, NO, prostanóides e enzimas pró-inflamatórias como a COX-2 (Figura 4) (ITO et al., 2006; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; WHITEHOUSE, 2011).



**Figura 3 – Via do ácido araquidônico e mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs).** Os AINEs atuam inibindo a enzima ciclooxigenase (COX) que catalisa a síntese de prostaglandinas. PGD<sub>2</sub> = prostaglandina D<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> = prostaglandina E<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> = prostaglandina F<sub>2</sub> *alpha*,

PGG<sub>2</sub> = prostaglandina G<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> = prostaglandina H<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> = prostaglandina I<sub>2</sub> ou prostaciclina, TXA<sub>2</sub> = tromboxano A<sub>2</sub>. Seta contínua (————→) = conversão; seta interrompida (—//—→) = inibição. Fonte: Adaptado de DANNHARDT; KIEFER, 2001.



**Figura 4 – Vias de sinalização genômica e não-genômica dos glicocorticoides em células T.** 1) via genômica clássica, demonstrando a transativação gênica da anexina 1, a qual inibe a enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, inibindo a via do ácido araquidônico, e a transrepressão gênica de mediadores pró-inflamatórios; 2) efeitos diretos na membrana; 3) sinalização por meio de um receptor de membrana (mGR); 4) interação do GR com proteínas sinalizadoras citoplasmáticas; 5) via mitocondrial. GC = glicocorticoide, GR = receptores de glicocorticoides, GRE = elementos responsivos aos glicocorticoides, TcR = receptor de células T. Seta contínua (————→) conversão; setas tracejadas (---→) = vias de sinalização não-genômica; seta interrompida (—//—→) = inibição. Fonte: Adaptado de BOLDIZAR et al., 2010.

## 1.6 HIPOTESE

H<sub>1</sub> = O extrato bruto, frações hexano, metanólica e acetato de etila, e os compostos isolados, ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil quínico e ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quínico provenientes das folhas da *Calea pinnatifida* Less. inibem a resposta inflamatória, pela diminuição da migração de leucócitos, exsudação, atividade das enzimas mieloperoxidase e adenosina-desaminase, concentrações dos metabólitos do óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A), bem como a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e proteína p38 MAPK, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados obtidos da folhas da *Calea pinnatifida* Less., administrados sistemicamente, utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados das folhas da *C. pinnatifida* sobre:

- 1- A migração dos leucócitos e a exsudação;
- 2- A atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-desaminase (ADA) e a concentração de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_x$ );
- 3- As concentrações das citocinas inflamatórias: fator de necrose tumoral-*alpha* ( $\text{TNF-}\alpha$ ), interleucina-1-*beta* ( $\text{IL-1}\beta$ ) e interleucina-17A ( $\text{IL-17A}$ );
- 4- A fosforilação da subunidade p65 do fator de transcrição nuclear- $\kappa\text{B}$  ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ) no tecido pulmonar (Apenas compostos isolados);
- 5- A fosforilação da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38-MAPK) no tecido pulmonar (Apenas compostos isolados).



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

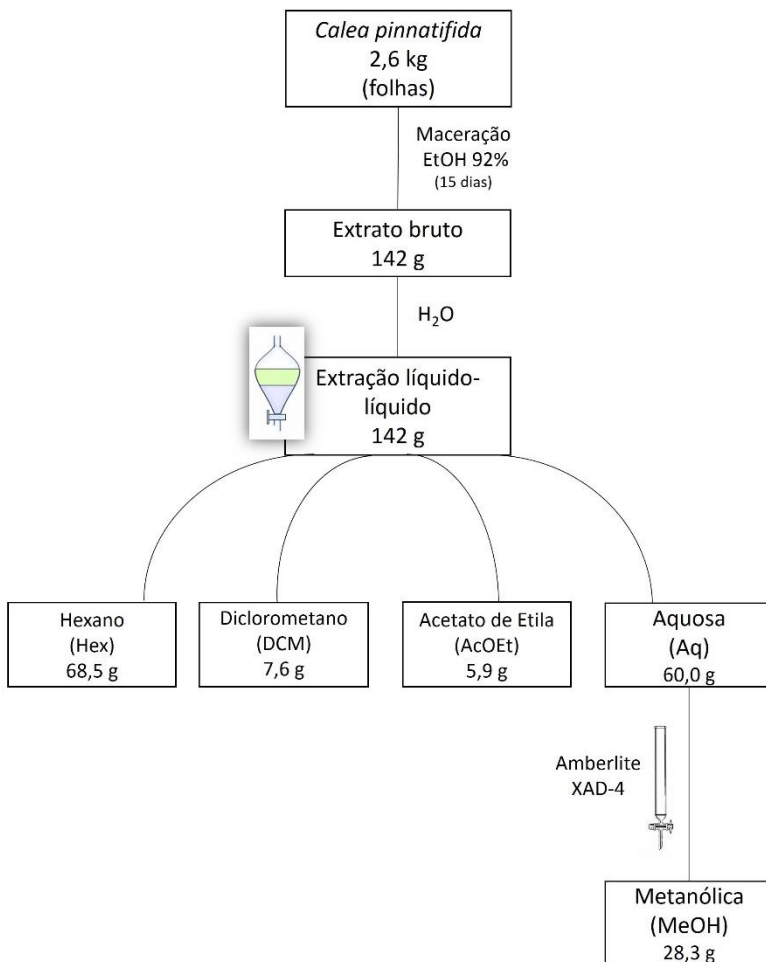
#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

##### 3.1.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas da *Calea pinnatifida* foram coletadas pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maique Weber Biavatti e sua aluna de doutorado Tamires Cardoso de Lima, ambas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Junho de 2013 no bairro da Costa da Lagoa no município de Florianópolis - Santa Catarina (SC), Brasil. A identificação botânica dos espécimes da *Calea pinnatifida* foi realizada pelo Dr. John Pruski. A excisada representativa do material coletado encontra-se depositada no herbário Missouri Botanical Garden, New York, sob número MO-2383318.

##### 3.1.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUENTES QUÍMICOS

As folhas frescas da *C. pinnatifida* (2,6 kg) foram submetidas a extração exaustiva por maceração com etanol (EtOH) a 92% durante 15 dias à temperatura ambiente (25 °C). O solvente foi removido sob pressão reduzida em um evaporador rotativo obtendo-se 142,0 g de extrato bruto (EB). O EB foi suspenso em água (H<sub>2</sub>O) e submetido a uma partição líquido-líquido, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade, com n-hexano seguido por diclorometano e acetato de etila, resultando nas seguintes frações: hexano (Hex: 68,5 g), diclorometano (DCM: 7,6 g) e acetato de etila (AcOEt: 5,9 g). A fração aquosa remanescente (AQ: 60,0 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna utilizando a resina Amberlite XAD-4, como fase estacionária e metanol como fase móvel, resultando na fração metanólica (MeOH: 28,3 g). Subsequentemente, uma alíquota da fração de acetato de etila (4,9 g) foi ainda fracionada por cromatografia líquida a vácuo (VLC) sobre gel de sílica e eluiu-se com diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas de polaridade crescente, fornecendo oito sub-frações, denominadas de A-H. A Sub-fração C (126,5 mg) foi purificada por meio de cromatografia líquida de média pressão (MPLC) sobre uma fase inversa RP-18 de coluna utilizando-se um sistema solvente gradiente de H<sub>2</sub>O-metanol (95:5 →



**Figura 5 – Extração do Material vegetal da *Calea pinnatifida*.** Hex: fração hexano; DCM: fração diclorometano; AcOEt: fração acetato de etila; Aq: fração aquosa; MeOH: fração metanólica.

0:100) como fase móvel para dar origem a 73 frações. As frações F50-53 foram eluídas com H<sub>2</sub>O-metanol (60:40), e forneceu 22,7 mg do composto 2. Uma alíquota 800,0 mg da sub-fração E foi submetida a uma cromatografia sobre uma coluna de Sephadex LH-20, utilizando acetona-metanol (1:1) como solvente, para se obter 37 frações. Com base no perfil da cromatografia em camada fina (TLC), as frações foram



recolhidas e reunidas em uma só alíquota (frações F16-19 (60 mg)) e esta foi ainda purificada por cromatografia líquida preparativa de alta eficiência (CLAE) para se obter 6,4 mg de composto 1 e 10,3 mg do composto 3, respectivamente. O sistema cromatográfico foi definido com eluição isocrática, caudal de 1,5 ml/min, volume de injeção de 1.000 µl, fase móvel acetonitrila-H<sub>2</sub>O (20:80, v/v) contendo ácido fórmico a 1%, e detecção por UV a 325 nm.

### 3.1.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ÚLTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO: UHPLC-DAD-HRESIMS)

As análises por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) foram realizadas no modo de eluição gradiente, empregando-se uma coluna C18 de fase reversa ACE® (3 µm de diâmetro de partícula, 150 x 3 mm), a 30 °C a uma vazão de 0,4 mL/min. Os extratos e frações orgânicas foram solubilizados em EtOH 70% (v/v), na concentração de 0,5 mg/mL. O volume injetado de cada amostra foi de 5,0 µL, e o tempo de eluição foi de 30 minutos. A fase móvel foi composta pelos solventes A (H<sub>2</sub>O) e B (acetonitrila - ACN), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v). O seguinte programa de eluição foi empregado: 0-17 min, 2-55% de B; 17-20 min, 55-100% de B; 24-27 min, 100-2% de B e 27-30 min, 2% de B. A detecção no ultravioleta (UV) foi realizada em três comprimentos de onda: 214 nm, 254 nm e 325 nm.

Os espectros de massas foram adquiridos simultaneamente em ambos os modos positivo e negativo, na faixa de varredura de 150-1200 *m/z*. Os seguintes parâmetros foram mantidos em todas as análises: resolução de 70.000, 200 ms para o máximo tempo de injeção, voltagem no spray de 3,6 kV e temperatura do capilar de 300 °C.

### 3.1.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e os mapas de correlação *Heteronuclear single quantum coherence* (HSQC) e *Heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC) foram realizados em espectrômetro Bruker Ascend 600, operando em 600 MHz para <sup>1</sup>H e 150 MHz para o núcleo de <sup>13</sup>C. As aquisições dos espectros foram realizadas utilizando metanol-*d*<sub>4</sub>. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão interno para a

referência de deslocamento químico (0,0 ppm). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software ACD/LABS, e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram expressas em hertz (Hz). Os espectros de massas de alta resolução (HRESIMS) foram obtidos em um UHPLC Accela™ equipado com detector ultravioleta acoplado com detector de arranjos de diodos (UV-DAD) e espectrômetro Exactive™ Plus (Thermo Fisher Scientific), com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador do tipo orbitrap. Os dados foram adquiridos e processados empregando o software Xcalibur™ (Thermo Fisher Scientific). As análises de CLAE preparativa foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu - Kyoto, Japan) equipado com central de controle SCL-10ADVP, duas bombas LC-10AD, detector UV SPD-10AV e injetor manual (volume de injeção 1000  $\mu$ L). Para separação cromatográfica foi empregada uma coluna de fase reversa C18 Luna (10  $\mu$ m, 250 x 10 mm, Phenomenex®). Silica gel 60 F<sub>254</sub> (0,04-0,63  $\mu$ m, 240-400 mesh), utilizada para a Cromatografia Líquida a Vácuo (VLC) e Cromatografia em Coluna (CC) (Vetec, Brazil). As seguintes placas de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram adquiridas (Silicycle; Sephadex LH-20 - Tedia Brazil; Amberlite XAD-4 - Supelco - Sigma Aldrich, Pte. Ltd, Singapore). Acetonitrila de alto grau analítico para CLAE foi adquirida da Dist (Florianópolis, SC, Brazil).

## 3.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

### 3.2.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo experimental, prospectivo e controlado.

### 3.2.2 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos albinos *Swiss*, um mês de idade, fêmeas, pesando entre 18 e 22 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Estes animais receberam alimentação e água *ad libitum* durante todo o experimento, acomodados em gaiolas plásticas com serralha, sob temperatura ambiente controlada ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luz natural. Esse protocolo foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA – protocolo nº PP00757/CEUA/2012), e os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de experimentação animal (CONCEA).

### 3.2.3 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

Neste protocolo experimental, a anestesia foi induzida com Xilasina (15 mg/kg, i.p.) e Cetamina (75 mg/kg, i.p.). A anestesia foi utilizada para a administração da solução de azul de Evans (25 mg/kg) administrado por via intravenosa (i.v.). A eutanásia dos animais ocorreu por overdose de anestésico, com administração de uma concentração 3 vezes maior que a utilizada no procedimento anestésico (Xilasina: 45 mg/kg, i.p.; Cetamina: 225 mg/kg, i.p.).

### 3.2.4 PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

A técnica da pleurisia seguiu o protocolo descrito por Saleh, Calixto e Medeiros (1996). No procedimento experimental, foram administrados 0,1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,95%) ou o agente flogístico carragenina (Cg, 1%), na cavidade pleural direita através do espaço intercostal dos animais. Após 4 h, os animais foram sacrificados com overdose de anestésico, o tórax foi aberto, a cavidade pleural foi exposta e lavada com duas alíquotas de 0,5 mL (totalizando 1 mL) de solução salina tamponada e heparinizada [pH 7,6, NaCl (130 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 mM) e heparina (20 UI/mL)]. Nas amostras do lavado pleural dos diferentes grupos estudados foram feitas as análises de migração leucocitária, exsudação, atividade enzimática de Mieloperoxidase (MPO) e Adenosina-desaminase (ADA), concentração dos metabólitos do óxido nítrico (NOx), bem como as concentrações das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A. As amostras do tecido pulmonar foram coletados apenas dos grupos de animais tratados com compostos isolados, para avaliar seus efeitos sobre a fosforilação de p65 (NF- $\kappa$ B) e p38 MAPK (Figura 5).

Para a avaliação indireta da exsudação, os animais foram tratados com uma solução do corante azul de Evans (25 mg/kg), administrados por via endovenosa (i.v.), 10 min antes do tratamento dos animais com EB, frações ou compostos isolados da *C. pinnatifida*. Na análise da atividade das enzimas MPO e ADA, bem como da concentração do nitrito/nitrato (NOx) e das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A, os animais não receberam a injeção com azul de Evans, uma vez que a administração do corante interfere diretamente nas dosagens colorimétricas e enzimáticas empregadas para a quantificação desses parâmetros.

### 3.2.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

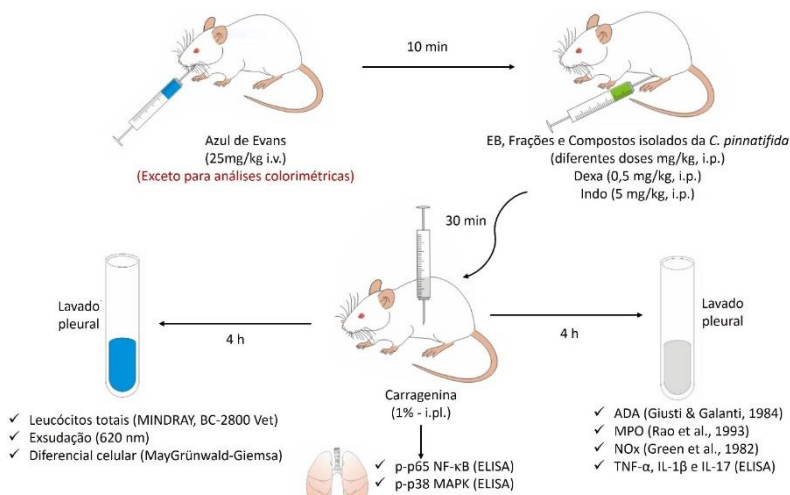
De acordo com o protocolo experimental, para a análise da curva dose resposta, diferentes grupos de animais foram tratados com diferentes doses de Extrato Bruto (EB): 25-100 mg/kg; frações Hexano (Hex): 5-25 mg/kg, Metanólica (MeOH): 5-25 mg/kg, Acetato de Etila (AcOEt): 2,5-25 mg/kg; Diclorometano (DCM): 5-25 mg/kg; Resíduo aquoso (R.Aq): 5-25 mg/kg e compostos isolados, Ácido 3,5-di-*O*-cafeoil quínico (3,5-diACQ): 1-5 mg/kg, Ácido 3,4-di-*O*-cafeoil quínico (3,4-diACQ): 1-5 mg/kg e Ácido 4,5-di-*O*-cafeoil quínico (4,5-diACQ): 1-5 mg/kg, administrados por via intraperitoneal (i.p) 0,5 h antes da indução da pleurisia pela Cg (1%) administrada por via intrapleurial (i.pl). Os parâmetros inflamatórios, exsudação e migração leucocitária também foram avaliados após 4 h (Figura 5).

Para avaliar o perfil temporal de resposta anti-inflamatória da *C. pinnaefida*, selecionamos a menor dose do EB capaz de inibir de maneira significativa a migração de leucócitos e as concentrações de exsudato. Neste protocolo, diferentes grupos de animais foram tratados com EB (50 mg/kg), 0,5, 1, 2 e 4 h antes da indução da pleurisia e os parâmetros inflamatórios também foram analisados após 4 h.

A curva tempo-resposta do EB (50 mg/kg) indicou que a atividade anti-inflamatória sobre a migração de leucócitos e concentrações de exsudato ocorreu quando administrados 0,5 h antes da indução do processo inflamatório (resultados não mostrados). Os resultados da curva tempo-resposta obtidos com o EB foram estendidos para as frações e compostos isolados.

A partir dos resultados obtidos nos estudos da curva dose-resposta e tempo-resposta, foram selecionadas as melhores doses (menor dose capaz de inibir a migração de leucócitos e exsudação) de EB, frações e compostos isolados (EB:50 mg/kg, Hex: 10 mg/kg, MeOH: 10 mg/kg, AcOEt: 5 mg/kg, 3,5-diACQ: 2,5 mg/kg e 4,5-diACQ: 5 mg/kg) a serem utilizadas para avaliar seus efeitos sobre a atividade das enzimas MPO e ADA, NOx, concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A no lavado da cavidade pleural dos animais e ainda o efeito dos compostos isolados sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e p38 MAPK no tecido pulmonar. Paralelamente nos experimentos, em um grupo de animais, foi administrado apenas Cg (1%), e a outro Salina estéril (NaCl 0,95%) administrados por via intrapleurial (i.pl.), tratando-se dos grupos de controle positivo e negativo, respectivamente. Outros grupos controles também foram avaliados utilizando-se fármacos de referência anti-inflamatórios. Foram estes: animais tratados com dexametasona (Dexa:

0,5 mg/kg) ou indometacina (Indo: 5 mg/kg) administrados por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da pleurisia com Cg (1%) e após 4 h os mesmos parâmetros inflamatórios foram analisados. Ressaltamos que a escolha da via intraperitoneal deve-se: 1) Este estudo avaliou o mecanismo de ação anti-inflamatório; 2) Não se pretendeu correlacionar o efeito de extrato bruto, frações e compostos da planta com a utilização na medicina popular; 3) A quantidade de material vegetal requerida para a administração oral equivale a 10 vezes o valor daquela utilizada por via intraperitoneal; 4) O fornecimento do material vegetal foi insuficiente para a administração oral, tendo em vista as dificuldades técnicas (infraestrutura e custos).



**Figura 6 – Modelo e protocolo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.** ADA = adenosina-desaminase, Dexa: dexametasona, ELISA = enzimmunoensaio, IL-1 $\beta$  = interleucina-1 *beta*, IL-17 = interleucina-17, Indo: indometacina MPO = mieloperoxidase, NOx = metabólitos do óxido nítrico, p-p65 NF- $\kappa$ B = subunidade p65 fosforilada, p-p38 MAPK = proteína p38 fosforilada, TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral alpha. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

### 3.3 TÉCNICAS UTILIZADAS

#### 3.3.1 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

Após a eutanásia dos animais (4 h após a indução da inflamação), alíquotas de 15  $\mu\text{L}$  dos lavados das cavidades pleural foram coletados para determinar a contagem total dos leucócitos, utilizando-se contador celular automatizado veterinário ajustado os parâmetros para camundongos (MINDRAY, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China). Os resultados foram expressos em número total de leucócitos  $\times 10^6/\text{mL}$ .

Para a contagem diferencial dos leucócitos, 50  $\mu\text{L}$  das alíquotas dos lavados da cavidade pleural foram centrifugados em citocentrífuga (Cytopro® cytocentrifuge Wescor, modelo: 7620 EUA) e as lâminas foram coradas utilizando a coloração de MayGrünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células  $\times 10^6$  (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

#### 3.3.2 QUANTIFICAÇÃO DO EXSUDATO PLEURAL

A exsudação foi avaliada através da quantificação do corante azul de Evans na cavidade pleural dos animais. Para isso, 10 min antes do tratamento dos animais com EB, frações e compostos isolados da *C. pinnatifida*, os grupos estudados receberam uma injeção intravenosa (i.v.) de uma solução de Azul de Evans (25 mg/kg) através da veia submandibular. Este, trata-se de um corante capaz de ligar-se a proteínas plasmáticas, como a albumina, podendo ser utilizado como um marcador indireto do extravasamento de exsudato na cavidade pleural. A medida das concentrações de exsudação foi realizada por meio de suas medições colorimétricas (620 nm), em um leitor de placas de enzaimunoensaio (ELISA) (Organon-Teknika, Roseland, NJ, EUA), utilizando uma curva padrão com concentrações conhecidas de Azul de Evans (0,01-50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para a interpolação dos resultados. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### 3.3.3 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

Para a determinação da atividade da MPO, realizou-se o ensaio de acordo com metodologia já descrita na literatura (RAO et al., 1993). Para isso, uma alíquota de 100 µl do lavado pleural, foi imediatamente misturado com a mesma proporção de brometo de hexadeciltrimetil amônio (HTAB 0,5%) e passou por um processo de congelamento e descongelamento em 3 ciclos, alternando com agitações vigorosas. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 40.000g por 15 minutos a 4°C. Vinte microlitros do sobrenadante das amostras, juntamente com 180 µl do meio de reação (0,167 mg/ml de o-dianisidina.2 ácido clorídrico (2HCl) e 0,0005% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)) foram colocados em placas de ELISA e incubadas a 37°C por 15 min. Decorrido esse tempo, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 15 µl de azida sódica (1%). Após incubação de 10 min a 37°C a atividade enzimática de cada amostra foi determinada a partir de suas medidas colorimétricas (450 nm), em um leitor de placas de ELISA (Organon-Teknika, Roseland, NJ, EUA), utilizando uma curva padrão de MPO (0.7 – 140 mU/mL) para a interpolação dos resultados. Os resultados foram expressos em mU/mL.

### 3.3.4 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADENOSINA-DESAMINASE (ADA)

Para a quantificação da atividade da ADA, realizou-se o ensaio de acordo com metodologia já descrita na literatura (GIUSTI; GALANTI, 1984). Para tanto, as amostras da cavidade pleural foram transferidas para tubos de ensaio e a reação foi iniciada a partir da adição de 250 µL de uma solução de adenosina tamponada (21 nM Adenosina; 35 mM Fosfato dissódico monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O); 15 mM de Fosfato dissódico duodecahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O) – pH 6,5). Após incubação de 1 hora à 37°C, 500 µL de uma solução de fenol/nitroprussiato de sódio (106 nM fenol; 0,17 nM nitroprussiato de sódio) e 500 µL de suma solução alcalina de hipoclorito de Sódio (NaOCl) (11 nM NaOCl; 125 nM de hidróxido de sódio (NaOH)) foram adicionados a cada amostra e incubadas à 37°C durante 30 minutos. A adenosina adicionada ao meio é clivada pela ADA, promovendo a produção de amônia. Esta, em uma reação dependente de pH alcalino e catalisada pelo nitroprussiato de sódio, reage com fenol e hipoclorito para a formação de indofenol de coloração azul. A concentração de amônia é proporcional à concentração

de indofenol gerado. Após os períodos de incubação, foram realizadas leituras colorimétricas (630 nm) de cada amostra para determinar suas atividades enzimáticas em um leitor de placas de ELISA (Organon-Teknika, Roseland, NJ, EUA) e para a interpolação dos resultados, uma solução de sulfato de amônio (35 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 15 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  e 15 mM de Sulfato de Amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) foi utilizada em triplicata como padrão de concentração referente a uma atividade enzimática de 20 U/L. Os resultados foram expressos em U/L.

### 3.3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO ( $\text{NO}_x$ )

A determinação das concentrações dos metabólitos do óxido nítrico (nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )/ nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )) no lavado pleural dos camundongos, foi realizada por meio da reação de Griess, de acordo com metodologia já descrita na literatura (GREEN et al., 1982). Inicialmente, 300  $\mu\text{L}$  das amostras foram tratadas previamente com 30  $\mu\text{L}$  de Sulfato de Zinco ( $\text{ZnSO}_4$  20%) para a sua desproteínezão. Após passar por uma incubação em banho de gelo por 45 min, a cada amostra, adicionou-se 6  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$  2,5 N) e essas foram centrifugadas a 2500 RPM por 15 min. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra foi transferido para uma placa de ELISA e posteriormente foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess (Sulfanilamida 1%; alpha-naphthyl-ethylendiamide 0,1% (1:1)) e 100  $\mu\text{L}$  de cloreto de vanádio III 0,8%. As amostras foram incubadas à 37°C durante 40 min e ao final desse período efetuou-se a medição colorimétrica (540 nm) de cada amostra, em um leitor de placas de ELISA (Organon-Teknika, Roseland, NJ, EUA) para determinar as concentrações de metabólitos do óxido nítrico, utilizando uma curva padrão com concentrações previamente conhecidas de  $\text{NO}_2^-$  (0-150 mM) para a interpolação dos resultados. Os resultados foram expressos em mM.

### 3.3.6 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE $\text{TNF-}\alpha$ , $\text{IL-1}\beta$ E $\text{IL-17A}$

Para a análise das concentrações de  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  E  $\text{IL-17A}$ , imediatamente após a eutanásia dos animais, alíquotas do lavado da cavidade pleural foram coletadas e processadas para quantificar as citocinas. Neste protocolo, kits comerciais disponíveis foram utilizados com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina ( $\text{TNF-}\alpha$ ,



eBioscience, Inc., San Diego, CA, EUA, Cat. 88-7342-29; IL-1 $\beta$ , eBioscience, Inc., San Diego, CA, EUA, Cat. 88-7913-29; IL-17A, eBioscience, Inc., San Diego, CA, EUA, Cat 88-7971-29). Coeficientes de variação (1) intra-ensaio: TNF- $\alpha$  =  $7.87 \pm 0.9\%$ , IL-1 $\beta$  =  $6.27 \pm 0.4\%$ , e IL-17A =  $7.57 \pm 1.7\%$ ; e (2) inter-ensaio: TNF- $\alpha$  =  $9.67 \pm 2.1\%$ , IL-1 $\beta$  =  $5.17 \pm 0.6\%$ , e IL-17A =  $9.67 \pm 2.1\%$ . Curvas-padrão com concentrações conhecidas de cada citocina também foram utilizadas para a quantificação dos valores desconhecidos com auxílio da equação da reta: TNF- $\alpha$  = 5–2000 pg/ml, IL-1 $\beta$  = 100–6400 pg/ml e IL-17A = 4–500 pg/ml. As leituras de todas as citocinas nas amostras e suas respectivas curvas-padrão foram estimadas por meio de suas medidas colorimétricas (450 nm), realizadas em leitor de placas de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA). Os valores foram expressos em pg/ml.

### 3.3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

Após a eutanásia dos animais, 20 mg de tecido pulmonar de cada amostra foi removido da cavidade torácica e transferido para tubo de eppendorf contendo tampão de lise - Cell Lysis Buffer (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA) com intuito de formar um homogenato.

A dosagem de proteínas totais foi realizada de acordo com metodologia descrita por Lowry et al. (1951) em espectrofotômetro. A 5  $\mu$ L de amostra foi adicionado 95  $\mu$ L de água destilada e então adicionou-se 100  $\mu$ L de reagente de Lowry (25% de Cobre-tartarato-carbonato; 25% de Dodecil sulfato de sódio – 10%; 20% de Hidróxido de sódio: NaOH 0,8 N e 30% de água destilada). Após incubação a temperatura ambiente por 10 minutos, adicionou-se 50  $\mu$ L de reagente de Folin (40% de Reativo de Folin 1 N, 20% de Reativo de Folin 2 N e 40% água destilada). Em seguida as amostras foram incubadas por 30 minutos, e passado este período efetuou-se a medição colorimétrica (620 nm) de cada amostra, em um leitor de placas de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA). Paralelamente utilizou-se diferentes concentrações de albumina (0-40  $\mu$ g/ $\mu$ l) para obter-se uma curva-padrão.

Esse procedimento foi realizado com o intuito de ajustar as concentrações de cada amostra para 60  $\mu$ g de proteína total, concentração sugerida pelos fabricantes dos kits para dosagem de p65 (NF- $\kappa$ B) e p38 MAPK fosforiladas.

### 3.3.8 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA p65 FOSFORILADA

Para este protocolo foi utilizado um kit comercial de ELISA contendo anticorpos monoclonais específicos contra proteína p65 fosforilada de camundongo (Instant One Phospho - NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) ELISA Kit (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA)). O protocolo experimental foi realizado seguindo instruções do fabricante disponíveis no kit. A análise foi realizada por método colorimétrico utilizando uma leitora de ELISA (Organon-Teknika, Roseland, NJ, USA) e a absorbância lida no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como modificação relativa de cada grupo de tratamento, comparado ao grupo controle negativo (animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%)), que representou a expressão basal da fosforilação da subunidade p65.

### 3.3.9 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA p38 FOSFORILADA

Semelhante a quantificação da fosforilação da proteína p65, nesse protocolo foi utilizado um kit comercial de ELISA com anticorpos específicos contra proteína p38 MAPK fosforilada (Instant One Phospho-p38 MAPK – Tyr180/Tyr182 – Elisa kit (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA)). O protocolo experimental foi realizado seguindo instruções do fabricante disponíveis no kit. A análise foi realizada por método colorimétrico utilizando uma leitora de ELISA (Organon-Teknika, Roseland, NJ, USA) e a absorbância lida no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em modificação relativa de cada grupo de tratamento, comparado ao grupo controle negativo (animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%)), que representou a expressão basal da proteína p38 MAPK fosforilada.

## 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

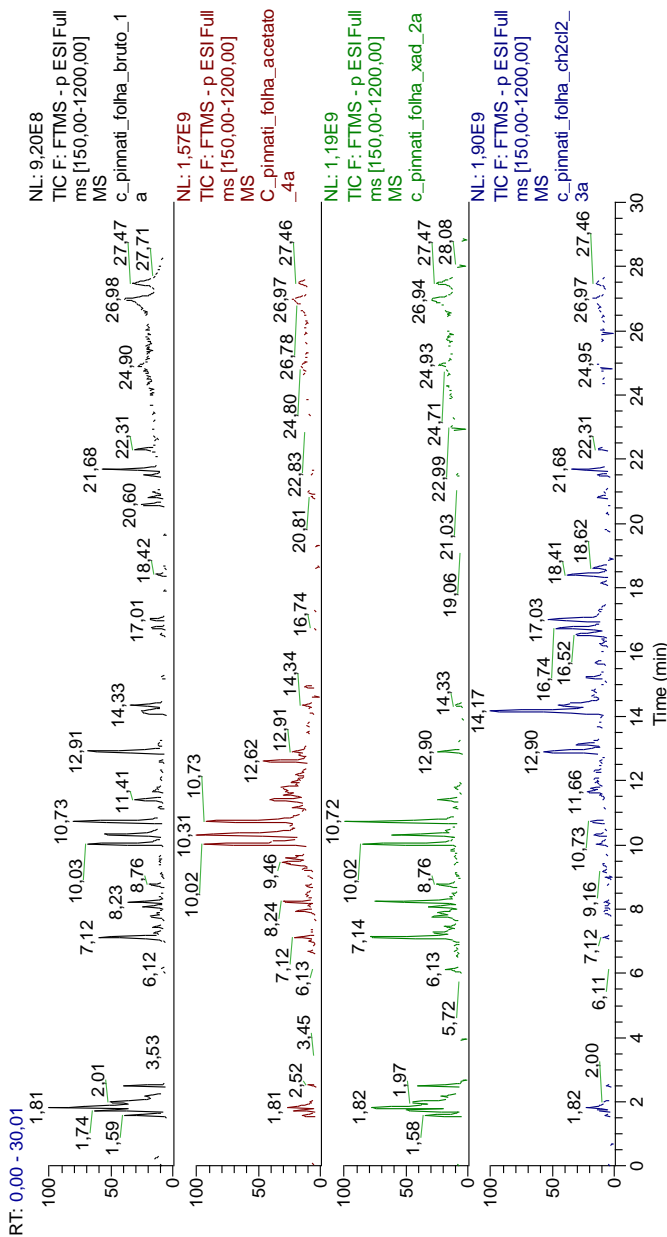
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) dos valores absolutos e das porcentagens de inibição. As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas utilizando análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Os resultados foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA) e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

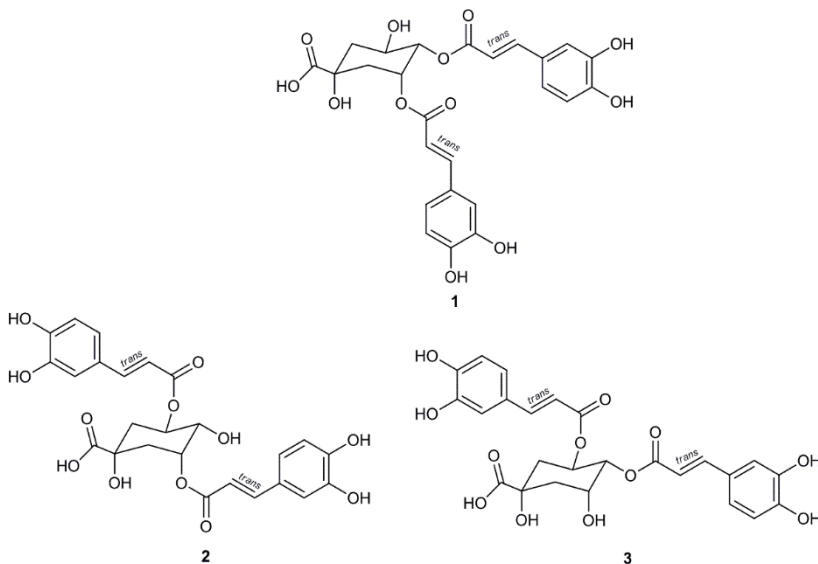
### 4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

A análise da composição química do extrato e frações orgânicas (acetato de etila, metanol e diclorometano) da *C. pinnatifida* por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-DAD-HRESIMS) revelou a presença de compostos fenólicos de diferentes classes químicas (flavonoides, derivados do ácido hidroxicínâmico e cromenos) e, com base no espectro de UV dos componentes com tempos de retenção de 10,03; 10,31 e 10,73 min, é possível sugerir a presença de derivados do ácido clorogênico (Figura 6). As análises por Cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas (LC-MS<sup>n</sup>) (modo negativo com fonte de ionização por Electrospray (ESI) e analisador do tipo Orbitrap) e a classificação hierárquica proposta por Clifford e colaboradores (2003, 2005, 2007 e 2008) para discriminar entre os isômeros do ácido dicafeoil quínico permitiu-nos concluir que estes derivados do ácido clorogênico são os compostos: C1 = ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoilquínico (3,4-diACQ), C2 = ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (3,5-diACQ) e C3 = ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (4,5-diACQ). A fração hexano não foi analisada por UHPLC em coluna de fase reversa porque os compostos apolares presentes na mesma podem exibir elevada adsorção nesta fase estacionária.

O fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila resultou no isolamento dos três isômeros descritos anteriormente: 3,4-diCQA (1), 3,5- diCQA (2) e 4,5-diCQA (3). As estruturas dos compostos (Figura 7) foram confirmadas como descrito por Lima e colaboradores (dados submetidos para publicação). O composto 2 foi identificado por comparação dos seus dados espectroscópicos de RMN 1D e 2D com dados publicados na literatura (LIMA et al., 2015b) e os compostos 1 e 3 foram distinguidos um do outro com base nos seus padrões de fragmentação, bem como no esquema de classificação hierárquica previamente estabelecido por Clifford e colaboradores (2003, 2005, 2007 e 2008) para caracterizar os derivados do ácido dicafeoil quínico.



**Figura 7 - Cromatogramas de íons totais no modo negativo (HRESIMS) do extrato bruto, fração acetato de etila, fração metanólica e fração diclorometano.** (A) extrato bruto; (B) fração acetato de etila; (C) fração metanólica; (D) fração diclorometano; 3,4-diACQ (1): tempo de retenção = 10,03 min; 3,5-diACQ (2): tempo de retenção = 10,31 min; 4,5-diACQ (3): tempo de retenção = 10,73 min.



**Figura 8 - Estruturas químicas dos compostos isolados da *Calea pinnatifida* Less.** C1 = Ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoil quínico (3,4-diACQ); C2 = Ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (3,5-diACQ); C3 = Ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (4,5-diACQ).

#### 4.2 PERFIL TEMPORAL DE RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO BRUTO DA *C. pinnatifida*

A curva tempo-resposta do EB (50 mg/kg) indicou que a atividade anti-inflamatória sobre a migração de leucócitos e concentrações de exsudato ocorreu quando administrados 0,5 h antes da indução do processo inflamatório. Os resultados da curva tempo-resposta obtidos com o EB foram estendidos para as frações e compostos isolados (Tabela 1).

Tabela 1 – Perfil temporal de resposta anti-inflamatória do extrato bruto da *C. pinnatifida* (50 mg/kg) sobre a migração de leucócitos e exsudação

Grupos/Doses (mg/kg)	Leucócitos (x10 <sup>6</sup> )	Neutrófilos (x10 <sup>6</sup> )	Exsudação (x10 <sup>6</sup> )
Sal	1,34 ± 0,05	0,74 ± 0,06	2,35 ± 0,15
Cg	6,86 ± 0,08	6,39 ± 0,09	16,00 ± 0,85

<b>Dexa 0,5</b>	3,34 ± 0,25**	3,13 ± 0,24**	10,15 ± 0,45**
<b>Indo 5</b>	3,80 ± 0,30 **	3,52 ± 0,28 **	11,41 ± 0,50 **
<b>EB 0,5h</b>	4,04 ± 0,26 **	3,59 ± 0,22 **	12,75 ± 0,71 **
<b>EB 1h</b>	6,54 ± 0,33	6,24 ± 0,28	11,91 ± 1,07 **
<b>EB 2h</b>	6,70 ± 0,38	6,44 ± 0,39	16,28 ± 1,16
<b>EB 4h</b>	6,72 ± 0,29	6,37 ± 0,21	16,92 ± 1,19

Extrato bruto (EB: 50 mg/kg), obtido das folhas da *Calea pinnatifida* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5h, 1 h, 2h e 4h antes da indução da pleurisia. Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%), administrados por via intra-pleural; Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a Média ± erro padrão da média de 6 animais. \*\* $p < 0,01$ . (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

#### 4.2 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *C. pinnatifida* SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS, NEUTRÓFILOS E A EXSUDAÇÃO

O extrato bruto (EB) da *C. pinnatifida*, nas doses de 50 e 100 mg/kg, inibiram significativamente a migração de leucócitos em 41,11 ± 3,76% e 41,69 ± 1,3%, ( $p < 0,01$ ). Esta inibição foi associada a uma diminuição do número de neutrófilos em 43,73 ± 1,70% e 43,86 ± 3,53%, ( $p < 0,01$ ). Além disso, o EB, nas mesmas doses foi capaz de inibir a exsudação em 20,25 ± 4,49% e 33,62 ± 4,76% ( $p < 0,05$ ) (Figura 8).

A fração Hex, nas doses de 10 e 25 mg/kg demonstrou efeito anti-inflamatório significativo ao inibir a migração de leucócitos em 67,72 ± 2,04% e 49,85 ± 3,64% ( $p < 0,01$ ). Este efeito foi devido à inibição do influxo de neutrófilos em 72,48% ± 1,41% e 52,13 ± 3,57% ( $p < 0,01$ ). A fração Hex também inibiu a exsudação em 26,66 ± 5,74% e 35,29 ± 7,94% ( $p < 0,01$ ) (Figura 9).

A fração MeOH, também nas doses de 10 e 25 mg/kg foi eficaz em inibir a exsudação em 29,23 ± 5,32% e 25,17 ± 6,46%, respectivamente ( $p < 0,01$ ). No entanto, no que diz respeito à migração de leucócitos, a fração MeOH teve um efeito inibitório nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg de 44,61 ± 7,16% a 51,90 ± 4,79% ( $p < 0,01$ ) e esta inibição também foi

relacionada com a diminuição do influxo de neutrófilos na cavidade pleural de  $44,19 \pm 20,23\%$  a  $52,06 \pm 5,9\%$  ( $p < 0,01$ ) (Figura 10).

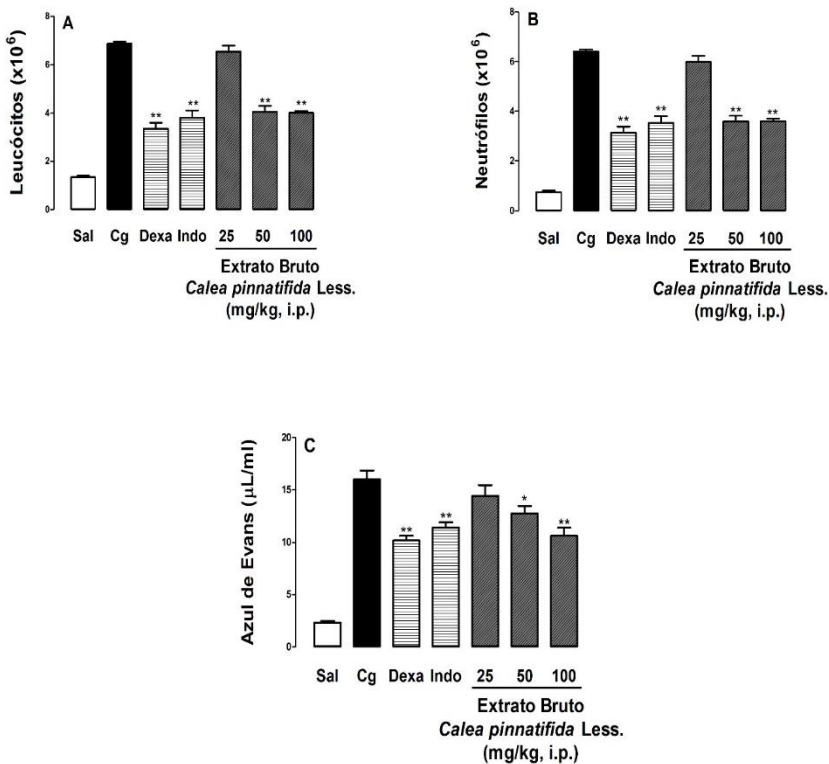
Da mesma forma que a fração MeOH, a fração AcOEt, nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg foi eficaz na inibição da migração de leucócitos de  $63,85 \pm 4,28\%$  a  $67,93 \pm 2,56\%$  ( $p < 0,01$ ), e de novo foi relacionado com a redução do influxo de neutrófilos de  $67,34 \pm 4,39\%$  a  $72,59 \pm 2,32\%$  ( $p < 0,01$ ). A fração AcOEt nas três doses testadas, também teve efeito significativo na redução do exsudato na cavidade pleural dos animais de  $33,49 \pm 2,91\%$  a  $52,69 \pm 8,83\%$  ( $p < 0,01$ ) (Figura 11).

Com base nestes resultados, optamos por isolar os compostos a partir da fração AcOEt, uma vez que esta fração apresentou o melhor efeito sobre os parâmetros inflamatórios estudados. Os nossos resultados demonstraram que os isômeros 3,5-diACQ e 4,5-diACQ possuem importantes propriedades anti-inflamatórias.

O 3,5-diACQ, nas doses de 2,5 e 5 mg/kg e o 4,5-diACQ apenas na dose de 5 mg/kg foram capazes em inibir a migração de leucócitos (% de inibição: 3,5-diACQ (2,5 mg/kg):  $27,78 \pm 4,87\%$  e 3,5-diACQ (5 mg/kg):  $37,08 \pm 6,69\%$ ; 4,5-diACQ (5 mg/kg):  $41,40 \pm 8,83\%$ ,  $p < 0,01$ ). Este perfil de inibição também foi devido à capacidade destes dois compostos em inibir a migração de neutrófilos (% de inibição: 3,5-diACQ (2,5 mg/kg):  $28,84 \pm 5,23\%$  e 3,5-diACQ (5 mg/kg):  $43,06 \pm 6,84\%$ ; 4,5-diACQ (5 mg/kg):  $44,00 \pm 9,64\%$ ,  $p < 0,01$ ). Nas mesmas doses, os dois compostos estudados também foram capazes de inibir a exsudação (% de inibição: 3,5-diACQ (2,5 mg/kg):  $31,79 \pm 5,02\%$  e 3,5-diACQ (5 mg/kg):  $36,96 \pm 4,74\%$ ; 4,5-diACQ (5 mg/kg):  $54,89 \pm 4,99\%$ ,  $p < 0,01$ ) (Figuras 12 e 13).

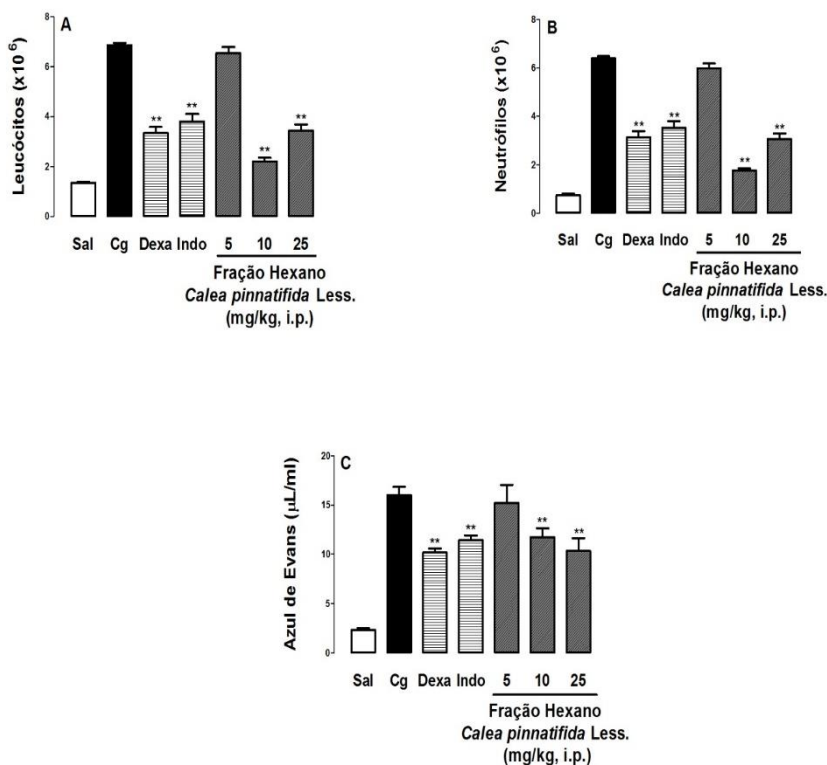
O isômero 3,4-diACQ, bem como as frações diclorometano e aquosa não mostraram nenhum efeito inibitório significativo sobre a migração de leucócitos e exsudação em nenhuma das doses estudadas (Figuras 14, 15 e 16).

Os resultados mostraram que o EB (50 mg/kg), as frações (Hex: 10 mg/kg; MeOH: 10 mg/kg; AcOEt: 5 mg/kg) e os compostos isolados (3,5-diACQ: 2,5 mg/kg; 4,5-diACQ: 5 mg/kg) foram eficazes na inibição da migração de leucócitos e exsudação. Assim, prosseguimos com essas doses para avaliar os demais parâmetros inflamatórios, como a atividade das enzimas MPO e ADA, concentrações de NOx e citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A e ainda o efeito dos compostos isolados sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e p38 MAPK no tecido pulmonar.

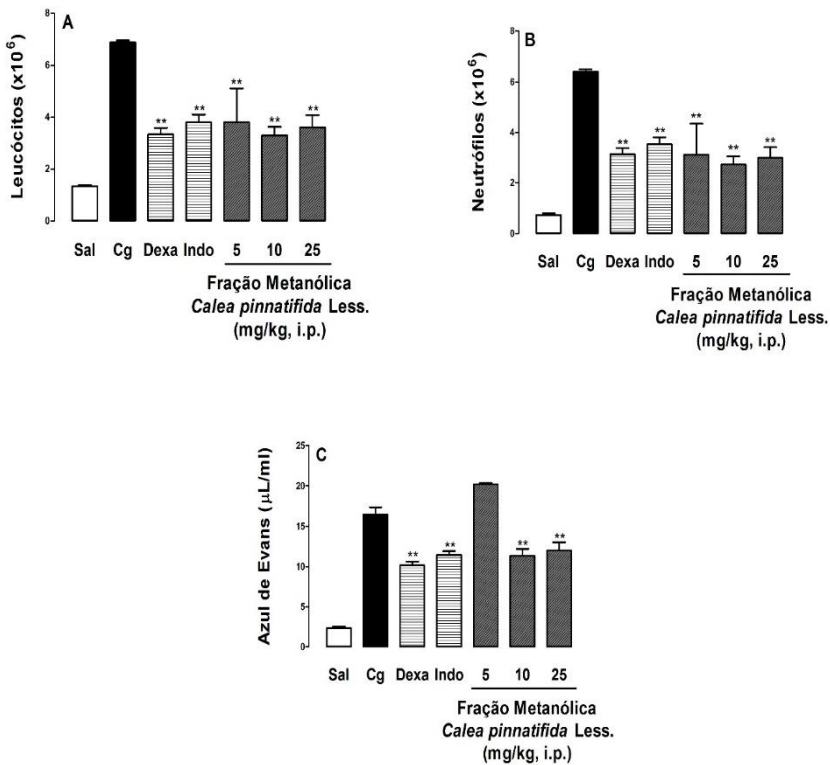


**Figura 9 – Efeito do extrato bruto da *Calea pinnatifida* Less. sobre a migração de leucócitos, neutrófilos e exsudação.** Extrato bruto (EB: 25-100 mg/kg), obtido das folhas da *Calea pinnatifida* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. A = Leucócitos; B = Neutrófilos; C = Azul de Evans; Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%), administrados por via intra-pleural; Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a Média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ . (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

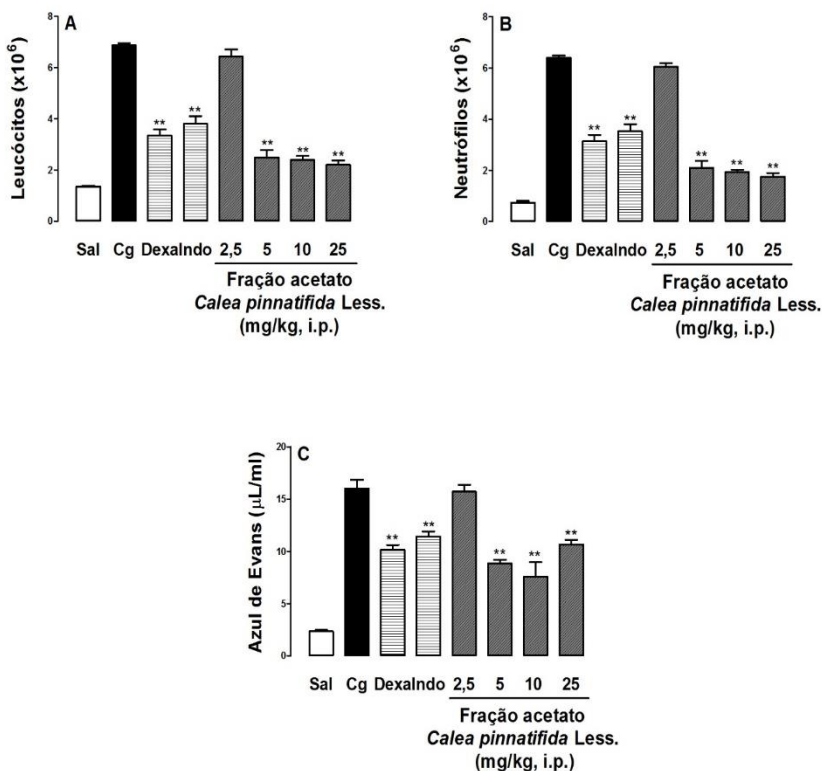




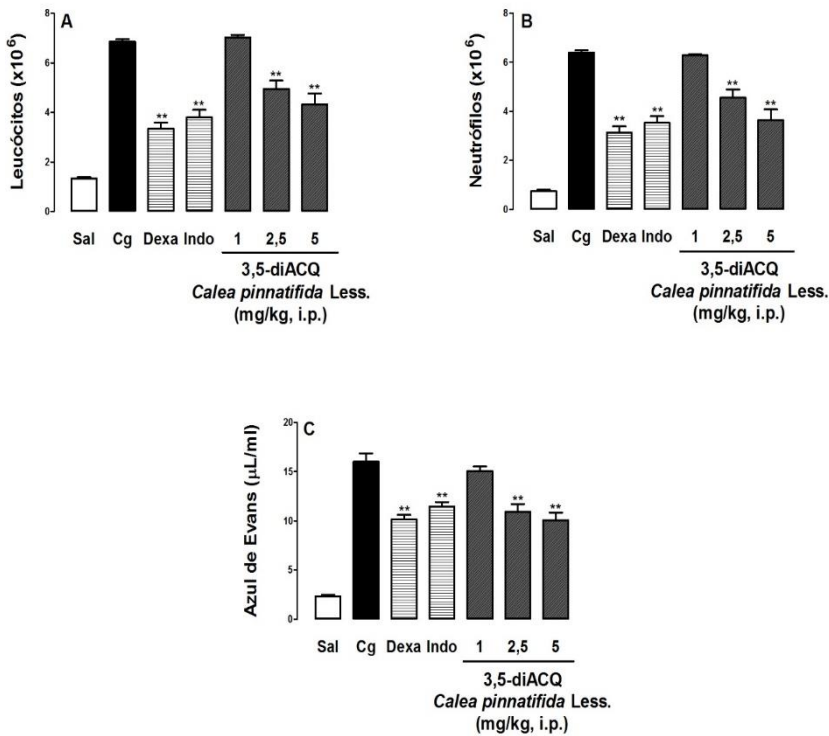
**Figura 10 – Efeito da fração hexano da *Calea pinnatifida* Less. sobre a migração de leucócitos, neutrófilos e exsudação.** Fração hexano (Hex: 5-25 mg/kg), obtido das folhas da *Calea pinnatifida* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. A = Leucócitos; B = Neutrófilos; C = Azul de Evans; Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%), administrados por via intra-pleural; Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a Média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais. \*\*  $p < 0,01$ . (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).



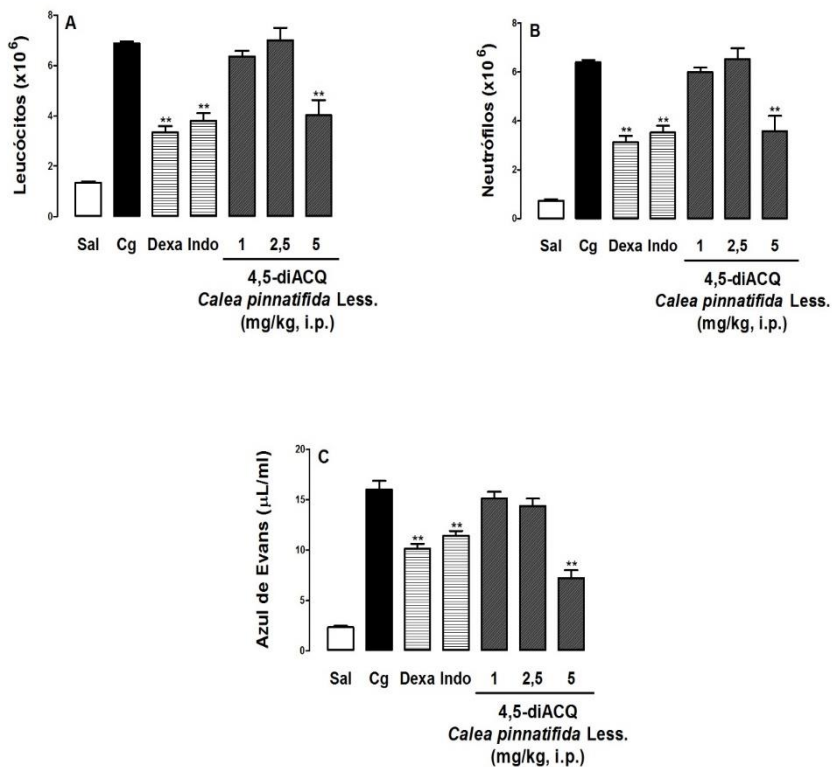
**Figura 11 – Efeito da fração metanólica da *Calea pinnatifida* Less. sobre migração de leucócitos, neutrófilos e exsudação.** Fração metanólica (MeOH: 5-25 mg/kg), obtido das folhas da *Calea pinnatifida* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. A = Leucócitos; B = Neutrófilos; C = Azul de Evans; Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%), administrados por via intra-pleural; Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a Média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais. \*\*  $p < 0,01$ . (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).



**Figura 12 – Efeito da fração acetato de etila da *Calea pinnatifida* Less. sobre migração de leucócitos, neutrófilos e exsudação.** Fração acetato de etila (AcOEt: 2,5-25 mg/kg), obtido das folhas da *Calea pinnatifida* Less., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. A = Leucócitos; B = Neutrófilos; C = Azul de Evans; Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%) administrados por via intra-pleural; Dexa= animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a Média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais. \*\*  $p < 0,01$ . (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).



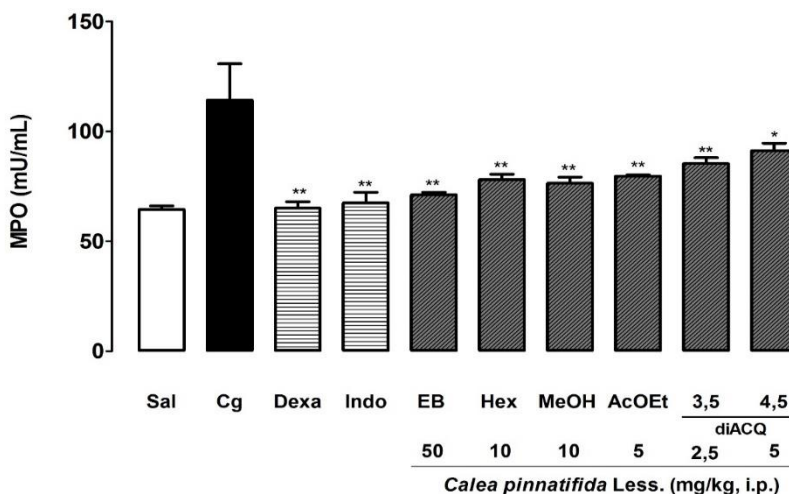
**Figura 13 – Efeito do Ácido 3,5-di-*O*-*E*-cafeoil quínico (3,5-diACQ) sobre migração de leucócitos, neutrófilos e exsudação.** Ácido 3,5-di-*O*-*E*-cafeoil quínico (3,5-diACQ: 1-5 mg/kg), administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. A = Leucócitos; B = Neutrófilos; C = Azul de Evans; Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%) administrados por via intra-pleural; Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a Média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais. \*\*  $p < 0,01$ . (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).



**Figura 14 – Efeito do Ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (4,5-diACQ) sobre migração de leucócitos, neutrófilos e exsudação.** Ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (4,5-diACQ: 1-5 mg/kg), administrado por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. A = Leucócitos; B = Neutrófilos; C = Azul de Evans; Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%) administrados por via intra-pleural; Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a Média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais. \*\*  $p < 0,01$ . (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

### 4.3 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *C. pinnatifida* SOBRE A ATIVIDADE MIELOPEROXIDASE (MPO)

O tratamento prévio dos animais com EB (50 mg/kg) e frações: Hex (10 mg/kg), MeOH (10 mg/kg) e AcOEt (5 mg/kg), bem como os compostos isolados 3,5-diCQA (2,5 mg/kg) e 4,5-diCQA (5 mg/kg), obtidos a partir das folhas da *C. pinnatifida*, causou uma diminuição significativa na atividade da Mieloperoxidase (% inibição: EB:  $37,73 \pm 01,03\%$ ; Hex:  $31,69 \pm 2,16\%$ ; MeOH:  $33,09 \pm 2,38\%$ ; AcOEt:  $30,25 \pm 0,39\%$ ; 3,5-diACQ:  $25,29 \pm 2,39\%$ ; 4,5-diACQ:  $20,10 \pm 2,93\%$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 14).

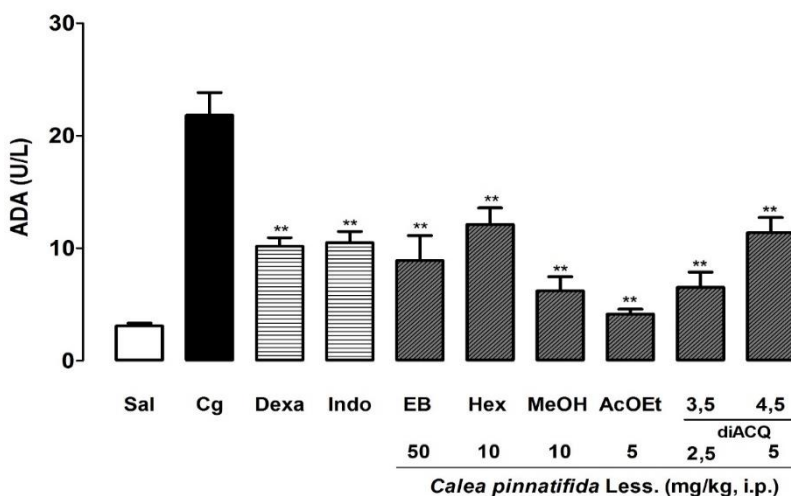


**Figura 15 – Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Calea pinnatifida* Less. sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).** Extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração hexano (Hex: 10 mg/kg), fração metanólica (MeOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 5 mg/kg), ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (3,5-diACQ: 2,5 mg/kg) e ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (4,5-diACQ: 5 mg/kg), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%) administrados por via intra-pleural; Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a Média  $\pm$  erro padrão

da média de 6 animais. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ . (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

#### 4.4 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *C. pinnatifida* SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA-DESAMINASE (ADA)

O tratamento prévio dos animais com EB (50 mg/kg) e frações: Hex (10 mg/kg), MeOH (10 mg/kg) e AcOEt (5 mg/kg), bem como os compostos isolados 3,5-diACQ (2,5 mg/kg) e 4,5-diACQ (5 mg/kg), obtidos da *C. pinnatifida*, causou uma diminuição significativa na atividade da Adenosina-desaminase (% inibição: EB: 59,17 ± 10,16; Hex: 44,48 ± 6,72%; MeOH: 71,59 ± 5,78%; AcOEt: 81,05 ± 2,06; 3,5-diCQA: 70,06 ± 6,08%; 4,5-diCQA: 47,87 ± 6,14%,  $p < 0,05$ ) (Figura 15).

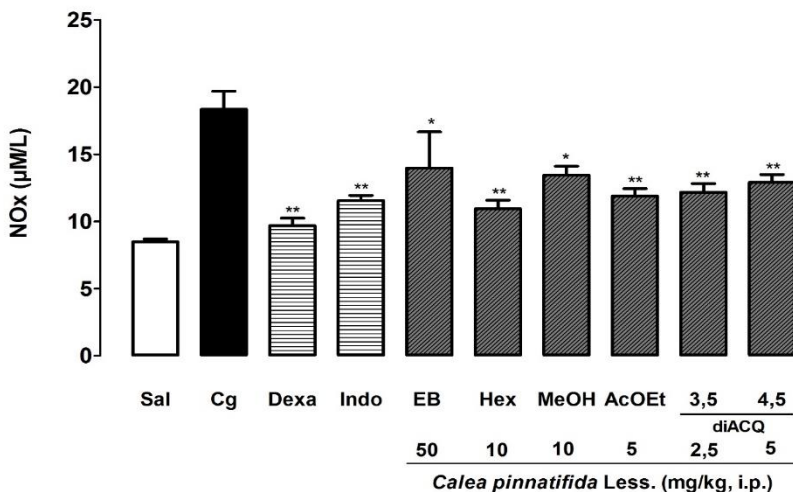


**Figura 16** – Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Calea pinnatifida* Less. sobre a atividade da enzima adenosina-desaminase (ADA). Extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração hexano (Hex: 10 mg/kg), fração metanólica (MeOH: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 5 mg/kg), ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (3,5-diACQ: 2,5 mg/kg) e ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (4,5-diACQ: 5 mg/kg) administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%) administrados por via intra-

pleural; Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a Média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais. \*\*  $p < 0,01$ . (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

#### 4.5 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *C. pinnatifida* SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO (NO<sub>x</sub>).

O tratamento prévio dos animais com EB (50 mg/kg) e frações: Hex (10 mg/kg), MeOH (10 mg/kg) e AcOEt (5 mg/kg), bem como os compostos isolados 3,5-diACQ (2,5 mg/kg) e 4,5-diACQ (5 mg/kg), obtidos da *C. pinnatifida*, causou diminuição significativa nas concentrações de nitrato/nitrito (% inibição: EB: 23,82  $\pm$  14,67%; Hex: 40,37  $\pm$  3,49%; MeOH: 26,68  $\pm$  3,60%; AcOEt: 35,27  $\pm$  03,11%, 3,5-diCQA: 33,60  $\pm$  3,44%; 4,5-diCQA: 29,63  $\pm$  3,13%,  $p < 0,05$ ) (Figura 16).



**Figura 17 - Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Calea pinnatifida* Less. sobre as concentrações de nitrato/nitrito (NO<sub>x</sub>).** Extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração hexano (Hex: 10 mg/kg), fração metanólica (MeOH: 10 mg/kg), fração Acetato de etila (AcOEt: 5 mg/kg), ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil quinico (3,5-diACQ: 2,5 mg/kg) e ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quinico (4,5-



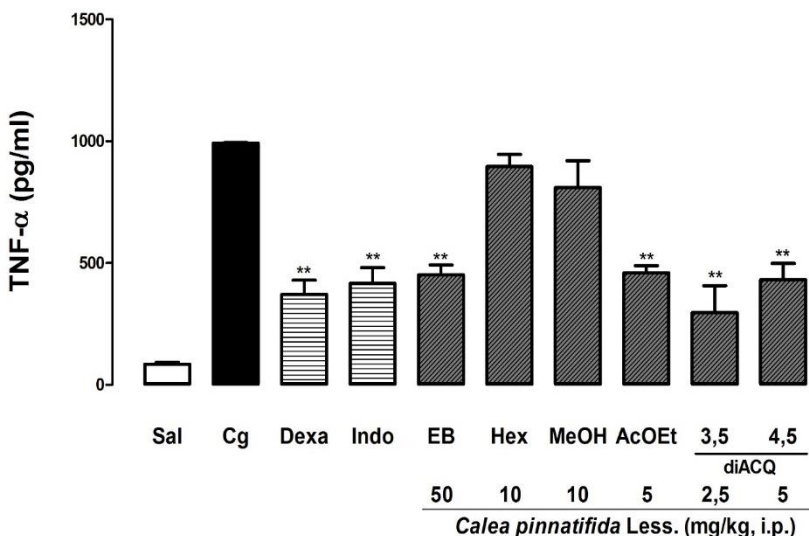
diACQ: 5 mg/kg) administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%) administrados por via intra-pleural; Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a Média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ . (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

#### 4.6 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *C. pinnatifida* SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ E IL-17A.

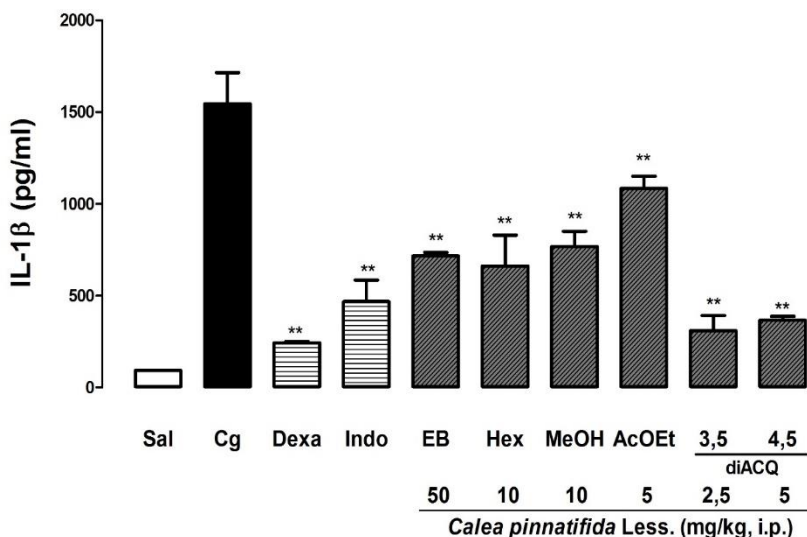
Também buscamos avaliar se a inibição da migração celular e as concentrações de exsudação estavam de alguma forma relacionados com a diminuição das concentrações de algumas citocinas pró-inflamatórias.

O tratamento prévio dos animais com EB, AcOEt e compostos isolados da *C. pinnatifida*, foram capazes de reduzir significativamente a concentração de TNF- $\alpha$  (% de inibição: EB:  $54,50 \pm 4,11\%$ ; AcOEt:  $53,73 \pm 3,03\%$ ; 3,5-diACQ:  $70,15 \pm 11,15\%$ ; 4,5-diCQA:  $56,45 \pm 6,76\%$ ,  $p < 0,01$ ). As frações Hex e MeOH não foram eficazes em diminuir a concentração desta citocina (Figura 17).

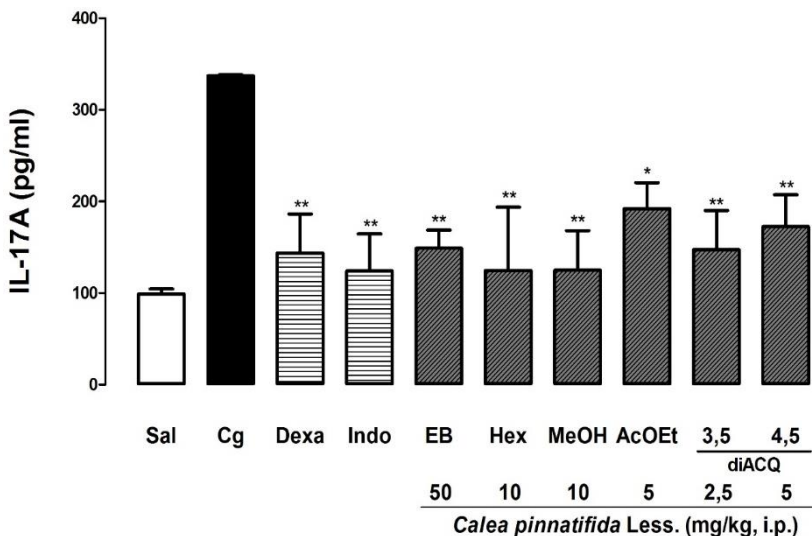
O EB, frações e compostos isolados também reduziram significativamente as concentrações de IL-1 $\beta$  (% de inibição EB:  $53,59 \pm 1,15\%$ ; Hex:  $57,20 \pm 10,88\%$ ; MeOH:  $50,29 \pm 5,34\%$ ; EtOAc :  $29,81 \pm 4,29\%$ ; 3,5-diCQA:  $79,94 \pm 5,29\%$ ; 4,5-diCQA:  $76,33 \pm 1,43\%$ ,  $p < 0,01$ ) (Figura 18) e IL-17A (% de inibição EB:  $55,87 \pm 5,88\%$ ; Hex:  $68,26 \pm 23,11\%$ ; MeOH:  $62,92 \pm 12,81\%$ ; AcOEt:  $42,99 \pm 8,39\%$ ; 3,5 diCQA:  $56,31 \pm 12,73\%$ ; 4,5-diCQA:  $60,02 \pm 18,50\%$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 19).



**Figura 18 – Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *C. pinnatifida* sobre as concentrações de TNF- $\alpha$ .** Extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração hexano (Hex: 10 mg/kg), fração metanólica (MeOH: 10 mg/kg), fração Acetato de etila (AcOEt: 5 mg/kg), ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil quinico (3,5-diACQ: 2,5 mg/kg) e ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quinico (4,5-diACQ: 5 mg/kg) administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%) administrados por via intra-pleural; Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a Média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais. \*\*  $p < 0,01$ . (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).



**Figura 19 – Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *C. pinnatifida* sobre as concentrações de IL-1 $\beta$ .** Extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração hexano (Hex: 10 mg/kg), fração metanólica (MeOH: 10 mg/kg), fração Acetato de etila (AcOEt: 5 mg/kg), ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil químico (3,5-diACQ: 2,5 mg/kg) e ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil químico (4,5-diACQ: 5 mg/kg) administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%) administrados por via intra-pleural; Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a Média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais. \*\*  $p < 0,01$ . (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).



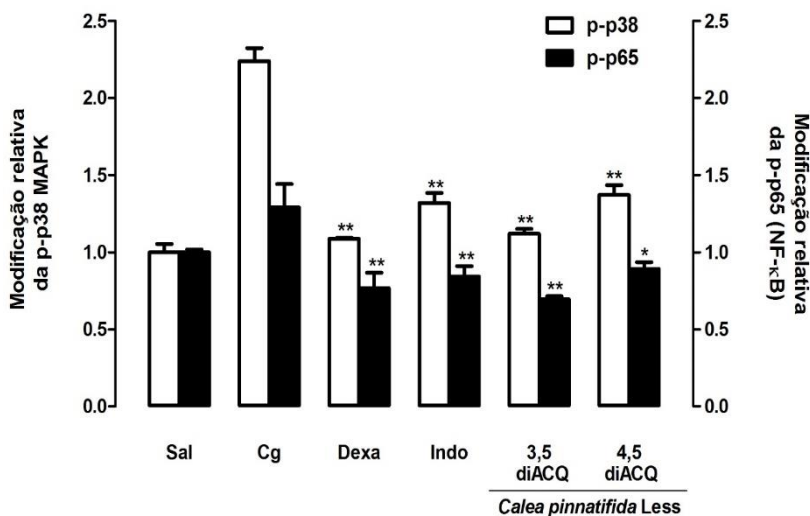
**Figura 20 – Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *C. pinnatifida* sobre as concentrações de IL-17A.** Extrato bruto (EB: 50 mg/kg), fração hexano (Hex: 10 mg/kg), fração metanólica (MeOH: 10 mg/kg), fração Acetato de etila (AcOEt: 5 mg/kg), ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil quinico (3,5-diACQ: 2,5 mg/kg) e ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quinico (4,5-diACQ: 5 mg/kg) administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%) administrados por via intra-pleural; Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a Média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ . (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

#### 4.7 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA *C. pinnatifida* SOBRE A FOSFORILAÇÃO DA SUBUNIDADE p65 (NF- $\kappa$ B) E p38 MAPK.

Por último, também buscamos avaliar se os efeitos anti-inflamatórios observados para a *C. Pinnatidida*, tanto em migração de leucócitos e exsudação, como na liberação de mediadores inflamatórios no líquido pleural dos camundongos, estariam relacionados com a capacidade dos compostos isolados em inibir vias de sinalização

intracelular, reduzindo a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B bem como a fosforilação da proteína p38 MAPK.

Nossos experimentos mostraram que os isômeros 3,5-diACQ e 4,5-diACQ foram eficazes em inibir a fosforilação da subunidade p65 (NF- $\kappa$ B) em  $46,23 \pm 1,59\%$  e  $30,96 \pm 3,48\%$ , respectivamente ( $p < 0,05$ ), e a fosforilação da p38 MAPK em  $50,00 \pm 1,43\%$  e  $38,75 \pm 2,83\%$ , respectivamente ( $p < 0,01$ ) (Figura 20).



**Figura 21 – Efeito dos compostos isolados ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil quinico (3,5-diACQ) e ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quinico (4,5-diACQ), sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e p38 MAPK.** 3,5-diACQ (2,5 mg/kg) e 4,5-diACQ (5 mg/kg), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Sal = controle negativo, animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,95%), administrados por via intra-pleural; Cg = controle positivo, animais tratados apenas com carragenina (1%) administrados por via intra-pleural; Dexa = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) 0,5 h antes da indução da pleurisia; Indo = animais tratados com Indometacina (5 mg/kg) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Cada grupo representa a modificação relativa em comparação com o grupo controle negativo (Sal), que representa a fosforilação basal das proteínas p65 e p38 fosforiladas. n = 6. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  (Análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).



## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstrou-se as propriedades anti-inflamatórias do extrato bruto, frações Hexano (Hex), Metanólica (MeOH), acetato de etila (AcOEt) e dos compostos isolados ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (3,5-diACQ) e ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (4,5-diACQ), isolados das folhas da *Calea pinnatifida*, administrados por via intraperitoneal, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

Este modelo caracteriza-se pelo aumento do influxo de neutrófilos para a cavidade pleural, o que permite avaliar o efeito do material vegetal sobre a migração de leucócitos, exsudação, além de diversos mediadores inflamatórios, presentes tanto no fluido pleural, bem como no tecido pulmonar.

O modelo da pleurisia tem sido amplamente utilizado para o estudo da inflamação neutrofílica das vias aéreas que é um dos componentes da resposta inflamatória em pacientes com doenças pulmonares como DPOC e alguns fenótipos de asma. O processo de migração neutrofílica para as vias aéreas desses pacientes está diretamente relacionado com a gravidade da doença e com a refratariedade do tratamento usual com corticosteroides. No entanto, os mecanismos subjacentes da neutrofilia das vias respiratórias não são bem compreendidos, mas parecem envolver a ativação e o fluxo contínuo desse tipo celular (SUKKAR et al., 2012).

Os dados demonstram que o EB, frações e compostos isolados, obtidos das folhas da *C. pinnatifida*, inibiram de maneira efetiva a migração de leucócitos na cavidade pleural inflamada pela Cg. Entre as frações estudadas, a fração AcOEt e MeOH demonstraram o melhor resultado sobre esse parâmetro, uma vez que reduziram a migração de leucócitos em uma dose de 5 mg/kg, ou seja, correspondente a metade da dose das fração Hex (10 mg/kg) e um quinto da dose efetiva do EB (50 mg/kg). No que diz respeito ao processo de exsudação, o EB e as frações Hex e AcOEt, inibiram este parâmetro nas mesmas doses capazes de inibir a migração de leucócitos, entretanto a fração MeOH só foi efetiva em inibir a exsudação em uma dose duas vezes maior (10 mg/kg). Já os compostos 3,5-diACQ e 4,5-diACQ, demonstraram resultados semelhantes, inibindo tanto a migração de leucócitos quando a exsudação, nas doses de 2,5 e 5 mg/kg, respectivamente.

Os ácidos dicafeoil quínicos são ácidos fenólicos, derivados do ácido clorogênico, sendo conhecidos pelas suas propriedades biológicas. Nos últimos anos, um conjunto de benefícios para a saúde têm sido

associados ao consumo do ácido clorogênico e seus derivados, incluindo a redução de risco relativo de distúrbios cardiovasculares, diabetes tipo 2 (SALAZAR-MARTINEZ et al., 2004; RANHEIM; HALVORSEN, 2005), doença de Alzheimer (LINDSAY et al., 2002), inibição da integração do HIV-1 (MCDOUGALL et al., 1998), atividade antibacteriana (ALMEIDA et al., 2006), hepatoprotetora (ZHENG et al., 2015), bem como antioxidante (SATO et al., 2011; HONG; JOO; JHOO, 2015) e anti-inflamatórias (HAN et al., 2010; HONG; JOO; JHOO, 2015; WU et al., 2015). Nossos resultados demonstram também que a inibição da migração de leucócitos pelo 3,5-diACQ e o 4,5-diACQ ocorreu as custas da inibição do influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório, em uma dose 20 e 10 vezes menor que o EB (50 mg/kg), respectivamente. Além disso, cabe ressaltar que o EB, frações e compostos isolados demonstraram-se tão eficazes na inibição destes parâmetros, quanto os fármacos de referência utilizados para o estudo, a indometacina e a dexametasona.

Nossos achados estão de acordo com outros estudos, que demonstraram que espécies do gênero *Calea*, possuem importante atividade anti-inflamatória, como os observados por Gomez e Gil (2011) e Guevara et al. (2011) que demonstraram que a *C. prunifolia* inibiu o edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e o edema da pata induzido pela carragenina, ambos em camundongos. Em outro estudo, também foi demonstrado o efeito anti-inflamatório do extrato aquoso da *C. zacatechichi* que diminuiu a migração de neutrófilos na inflamação peritoneal induzida por carragenina, em ratos (VENEGAS-FLORES; SEGURA-COBOS; VÁZQUEZ-CRUZ, 2002) e os efeitos anti-inflamatórios e anti-nociceptivos do extrato metanólico da *C. zacatechichi* que inibiu o edema de pata induzido por carragenina e as contorções abdominais induzidas por ácido acético, em camundongos e ratos, respectivamente. Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que o extrato metanólico da *C. zacatechichi* também inibiu a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) em macrófagos ativadas induzidos por lipopolissacarídeo (LPS), isolados da cavidade peritoneal de ratos (SEGURA-COBOS et al., 2010).

Para avaliar a ativação de neutrófilos no local da inflamação foi quantificada a atividade da MPO. Esta é uma enzima abundantemente expressa em neutrófilos e em menor grau em monócitos, e sua atividade está diretamente relacionada com a atividade fagocítica destas células, sendo assim uma ferramenta útil para avaliar indiretamente a presença de neutrófilos ativados no sítio inflamatório (NUSSBAUM et al., 2013). Os nossos resultados demonstraram que o EB e frações, obtidos a partir das



folhas da *C. pinnatifida*, bem como os compostos 3,5-diACQ e 4,5-diACQ, foram efetivos em diminuir a atividade da MPO, o que sugere que a *C. pinnatifida* não só inibe a migração de neutrófilos para a cavidade pleural, como também a ativação celular durante o processo inflamatório. Nossos achados corroboram com Gongora e colaboradores (2002), que demonstraram o efeito inibitório do 3,5-diACQ e 4,5-diACQ sobre a atividade da MPO em cultura de polimorfonucleares humanos estimulados com TPA. Além disso, um estudo realizado recentemente em nosso grupo de pesquisa, demonstrou o efeito inibitório de uma mistura de ácidos dicafeoil quinicos sobre a atividade da MPO no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos (DE SOUZA et al., 2015).

A atividade anti-inflamatória da *C. pinnatifida* também foi associada a diminuição da atividade da adenosina-desaminase (ADA). A ADA é uma enzima importante no processo inflamatório, que catalisa a desaminação irreversível da adenosina em inosina (HASKÓ et al., 2007). Nos tecidos inflamados, os neutrófilos podem ser a fonte principal de adenosina e este mediador, de maneira autócrina, pode estimular ou inibir a função dos neutrófilos em função da sua concentração no microambiente e do tipo de receptor ativado (BOURS et al., 2006; JUNGER, 2011). No tecido pulmonar e nos neutrófilos, os receptores do tipo A<sub>2A</sub> medeiam a maioria dos efeitos anti-inflamatórios da adenosina, e a expressão desse receptor está aumentada no tecido pulmonar inflamado (REUTERSHAN; CAGNINA; CHANG, 2007; BARLETTA; LEY; MEHRAD, 2012; KONRAD et al., 2013). Estudos utilizando camundongos deficientes de receptor A<sub>2A</sub>, demonstraram que a ativação deste receptor promoveu um efeito anti-inflamatório endógeno, reduzindo a reatividade das vias aéreas, bem como a infiltração de células inflamatórias (NADEEM et al., 2007). Dessa forma, apesar da adenosina não ter sido avaliada, é possível que parte dos efeitos anti-inflamatórios ocasionados pela *C. pinnatifida*, ocorreram pela sua capacidade de inibição da atividade da ADA, com conseqüente aumento das concentrações extracelulares de adenosina no sítio inflamatório, que podem levar a ativação de receptores A<sub>2A</sub>, promovendo efeitos anti-inflamatórios.

Relacionando o EB com as frações estudadas, verificou-se que a fração AcOEt apresentou o melhor resultado em relação a inibição da atividade da MPO e ADA, isto porque esta fração foi capaz de inibir a atividade destas enzimas em uma dose inferior (5 mg/kg), quando comparada ao EB (50 mg/kg) e as frações Hex (25 mg/kg) e MeOH (10 mg/kg).

O EB, frações e compostos isolados da *C. pinnatifida* também foram capazes de suprimir a concentração de exsudato na cavidade pleural inflamada pela carragenina e este efeito foi diretamente relacionado com a liberação de óxido nítrico (NO). O NO tem vários papéis na resposta imunológica, incluindo o controle de infecções, regulação de cascatas de sinalização e fatores de transcrição, rolamento e migração de leucócitos, produção de citocinas e também o controle das respostas vasculares (MAO et al., 2013). A vasodilatação é um dos principais sinais da resposta inflamatória, e este é um processo dependente de NO (TOUSOULIS et al., 2012). Um estudo utilizando o modelo da pleurisia induzida por carragenina, em ratos, demonstrou que a inibição da NOS promoveu uma diminuição nas concentrações de NOx e na exsudação (SAKAGUCHI et al., 2006). Além disso, em um modelo de edema pulmonar em ratos, foi demonstrado que a diminuição da formação de edema estava relacionada com a diminuição da liberação de NO e da PGE (CHEN et al., 2013).

Estudos *in vitro*, já demonstraram o efeito inibitório do 3,5-diCQA e 4,5-diCQA na produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas com LPS (PUANGPRAPHANT et al., 2011; HONG; JOO; JHOO, 2015). Esses achados corroboram com os nossos resultados, uma vez que nossos experimentos demonstraram que tanto o 3,5-diACQ quanto o 4,5-diACQ, foram efetivos em diminuir as concentrações de NOx, nas doses de 2,5 e 5 mg/kg, respectivamente.

O TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são duas importantes citocinas pró-inflamatórias, secretadas principalmente por neutrófilos e macrófagos, que desempenham um papel central no aparecimento e na progressão da resposta inflamatória (TURNER et al., 2014). Essas duas citocinas estão envolvidas na patogênese de diversas doenças de caráter inflamatório, como artrite reumatóide (AR), doença inflamatória do intestino, asma, e DPOC, sendo que seus efeitos estão relacionados principalmente com a ativação do NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição chave na expressão de genes responsáveis pela síntese de diversos mediadores pró-inflamatórios (HOLGATE, 2004; CHUNG, 2006; WILLIAMS; PALEOLOG; FELDMANN, 2007). Fröde e colaboradores (2001), já relataram o envolvimento do TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na inflamação induzida por carragenina em camundongos, sendo que a transcrição e a liberação destas citocinas por neutrófilos e macrófagos, ocorre em resposta a ativação de TLR4 pela carragenina (REYNOLDS, 2007). Um estudo realizado por Thomas e Heywood (2002), demonstrou que a inalação de TNF- $\alpha$  promove um aumento da responsividade das vias aéreas bem como um aumento da porcentagem de neutrófilos no escarro de indivíduos saudáveis,

demonstrando a importância dessa citocina no processo de neutrofilia das vias aéreas. Também já foi relatado os efeitos benéficos da inibição de TNF- $\alpha$  em modelos murinos de inflamação pulmonar bem como em pacientes asmáticos (BABU et al., 2011; CATAL et al., 2014). Achados recentes também apontam que ocorre um aumento nas concentrações de IL-1 $\beta$  no escarro de pacientes com DPOC e asma neutrofílica, bem como em modelos experimentais de enfisema pulmonar induzido por fumaça de cigarro, em camundongos (CHURG et al., 2009; BAINES et al., 2011; BECKETT et al., 2013; SIMPSON et al., 2014). Além disso, existe um aumento nas concentrações de IL-1 $\beta$  no escarro e no lavado bronco-alveolar de pacientes fumantes em comparação a pacientes não fumantes (EKBERG-JANSSON et al., 2001; CHUNG, 2006).

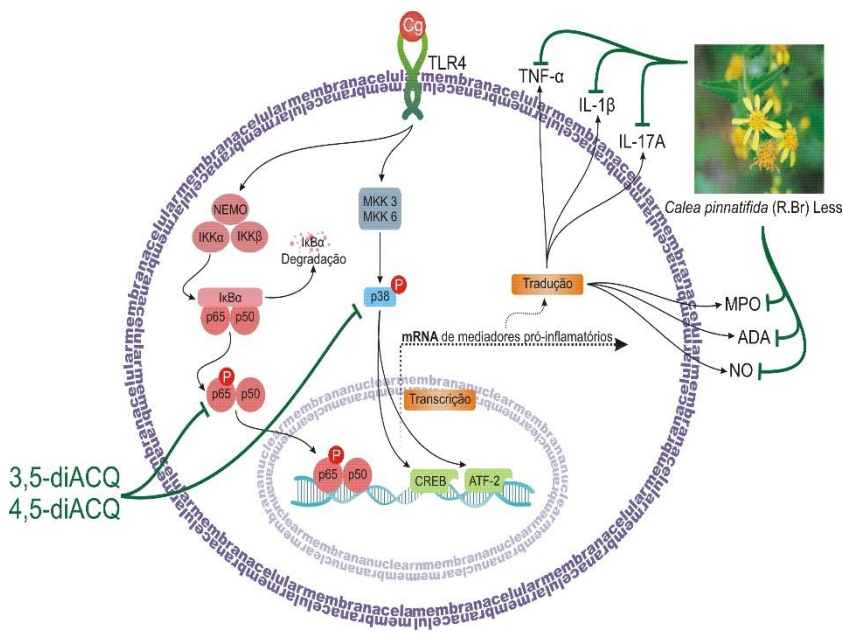
Em nossos experimentos, EB, frações e compostos isolados da *C. pinnatifida*, foram eficazes em inibir as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na cavidade pleural dos camundongos, após a indução do processo inflamatório. Nossos achados corroboram com estudos prévios *in vitro*, que demonstraram a capacidade dos ácidos cafeoil quínicos em inibir a expressão de TNF- $\alpha$  em macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS (HONG; JOO; JHOO, 2015), e diminuir a produção de IL-1 $\beta$  em queratinócitos humanos após estímulo com TNF- $\alpha$  (LEE et al., 2011).

Além do TNF- $\alpha$ , outra citocina que está diretamente relacionada com o recrutamento de neutrófilos bem como o desenvolvimento de doenças de caráter inflamatório é a IL-17A. Os seus efeitos ocorrem principalmente pela estimulação da secreção de mediadores inflamatórios por outras de células, como macrófagos e células endoteliais (IWAKURA et al., 2011; MIOSSEC; KOLLS, 2012; MORISHIMA et al., 2013). O TNF- $\alpha$  e a IL-17A sustentam o recrutamento de neutrófilos durante o processo inflamatório por meio de efeitos sinérgicos sobre ativação endotelial (GRIFFIN et al., 2012). Dessa forma, uma vez que a IL-17A é capaz de induzir o influxo de neutrófilos para tecidos inflamados, também é natural que se considere a relação entre a IL-17A e neutrofilia das vias respiratórias (IWAKURA et al., 2011; MORISHIMA et al., 2013). Em nosso estudo, o tratamento prévio dos animais com EB, frações e compostos isolados também foram eficazes em reduzir as concentrações de IL-17A no lavado pleural dos camundongos após a indução da pleurisia. O aumento das concentrações de IL-17A ou na expressão de seu RNA mensageiro foram detectados no escarro (BULLENS et al., 2006), lavado bronco-alveolar (MOLET et al., 2001), tecido brônquico (VAZQUEZ-TELLO et al., 2010), e soro (AGACHE et al., 2010; ALBANO et al., 2013) de pacientes com asma.

Devido aos significativos efeitos anti-inflamatórios observados para o EB, frações derivadas e compostos isolados da *C. Pinnatifida* sobre os parâmetros de migração leucocitária, exsudação, diminuição da atividade da MPO e ADA e de mediadores como NOx e citocinas pró-inflamatórias, buscou-se avaliar se estes efeitos poderiam estar relacionados a capacidade dos compostos 3,5-diACQ e 4,5-diACQ em inibir fatores de transcrição bem como vias de sinalização envolvendo MAPK. Os nossos resultados demonstraram que ambos os isômeros do ácido dicafeoil quínico testados, 3,5-diACQ e 4,5-diACQ, tiveram a capacidade de inibir a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B bem como da p38 MAPK. No entanto, o 3,5-diCQA mostrou um efeito inibitório dessas vias utilizando uma dose duas vezes menor (2,5 mg/kg) quando comparado com o seu isômero 4,5-diCQA (5 mg/kg). A via do NF- $\kappa$ B é conhecida por sua importância no aumento da expressão de vários genes pró-inflamatórios incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (LAWRENCE, 2009). Estudos recentes *in vitro*, mostram que tanto o 3,5-diACQ quanto o 4,5-diACQ, interferem na translocação nuclear da p65 em macrófagos RAW.264.7 estimulados com LPS, através da inibição da degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ , uma importante proteína inibitória desta via (CHEN et al., 2015; PUANGPRAPHANT et al., 2011). Além disso, estes resultados corroboram com outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, que demonstrou o efeito inibitório de uma mistura de isômeros dos ácidos dicafeoil quínicos sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B no tecido pulmonar de camundongos, utilizando o modelo da pleurisia induzida por carragenina (DE SOUZA et al., 2015).

Não menos importante, a p38 MAPK desempenha um papel chave nas respostas inflamatórias e evidências sugerem que a via da p38 está envolvida no desenvolvimento de doenças de caráter inflamatório, como a artrite e no processo inflamatório de diversos tecidos, incluindo o pulmão (YANG et al., 2014). Entre as consequências da ativação desta via, destaca-se a produção de citocinas pró-inflamatórias, a indução de óxido nítrico sintase (NOS), a proliferação e diferenciação celular, além da indução de apoptose (YANG et al., 2014). Da mesma forma que em nossos achados, um estudo avaliando o efeito de uma mistura de polifenóis isolados da *Lonicera japonica* THUNB, contendo ácidos dicafeoil quínicos, demonstrou a capacidade desses compostos em inibir a fosforilação da p38 MAPK em macrófagos RAW246.7 estimulados com LPS (PARK et al., 2012). Além disso, a inibição dessa via pelos ácidos dicafeoil quínicos presentes em um extrato metanólico de própolis, também foi observada em outro estudo *in vitro* utilizando macrófagos

RAW246.7 estimulados com LPS e novamente esses compostos se mostraram efetivos em inibir a fosforilação da p38 MAPK (BUFALO et al., 2013).



**Figura 22 - Resumo gráfico dos efeitos da *Calea pinnatifida* (R.Br) Less. sobre os mediadores inflamatórios estudados.** 3,5-diACQ: ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil quinico; 4,5-diACQ: ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil quinico; ADA: adenosina-desaminase; ATF-2: Fatores de transcrição dependentes de monofosfato de adenosina; Cg: Carragenina; CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta ao monofosfato cíclico de inibitória *kappa* B quinase *beta*; IκBα: Subunidade inibitória do NF-κB *alpha*; IL-1β: Interleucina-1-*beta*; IL-17A: Interleucina 17A; MPO: mieloperoxidase; MKK3/6: Proteína quinase dupla induzida por mitógeno 3/6; NEMO: Proteína inibitória *kappa* B quinase *gamma*; NF-κB: fator de transcrição nuclear *kappa*-B; NO: óxido nítrico; p50: Subunidade (p50) do fator nuclear NF-κB; p65: Subunidade (p65/RelA) do fator nuclear NF-κB; TLR4: Receptor toll-like 4; TNF-α: Fator de necrose tumoral *alpha*; TNFR: Receptor de TNF.

É importante ainda ressaltar, que apesar de os compostos isolados não terem apresentado seus efeitos anti-inflamatórios em uma dose tão baixa quanto a dexametasona, no que diz respeito a potência de ação, o

composto 4,5-diACQ teve um efeito semelhante a indometacina, uma vez que o mesmo foi capaz de inibir os parâmetros inflamatórios avaliados na dose de 5 mg/kg, mesma dose da indometacina, anti-inflamatório não-esteroidal de referência utilizado para o estudo. Ainda, quando comparado ao mesmo fármaco, o composto 3,5-diACQ apresentou seus efeitos anti-inflamatórios em uma dose duas vezes menor (2,5 mg/kg), mostrando-se mais potente em inibir os parâmetros inflamatórios avaliados.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez o efeito anti-inflamatório da *Calea pinnatifida* Less. em um modelo *in vivo* de inflamação pulmonar aguda. Os resultados apresentados, mostram que o EB, frações derivadas e os compostos isolados da planta apresentam propriedades anti-inflamatórias significativas por:

1 - Inibir o influxo de leucócitos para a cavidade pleural bem como diminuir o processo de exsudação local, que foi relacionado com a diminuição da liberação de substâncias vasoativas, como o NO;

2 - A inibição do influxo leucocitário se deu às custas da inibição do influxo de polimorfonucleares do tipo neutrófilo e da diminuição da atividade de enzimas relacionadas com a ativação dessas células (MPO e ADA);

3 - A planta inibiu a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A, componentes envolvidos sinergicamente na ativação e quimiotaxia de células inflamatórias.

4 - Estes efeitos estão, em parte, relacionados com a capacidade dos compostos isolados em atuar diretamente na inibição da fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e da p38 MAPK, duas vias intracelulares importantes no desenvolvimento, progressão e manutenção de processos inflamatórios.





## 8. REFERÊNCIAS

AGACHE, I. et al. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. **Respiratory Medicine**, v. 104, n. 8, p. 1131–1137, 2010.

ALBANO, G. D. et al. Th17 Immunity in Children with Allergic Asthma and Rhinitis: A Pharmacological Approach. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

ALMEIDA, A. A. P. et al. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8738–8743, 2006.

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

ANTONIOLI, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 6, p. 355–367, 2013.

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

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.

AZADEGAN-DEHKORDI, F. et al. The role of Th1 and Th17 cells in glomerulonephritis. **Journa of Nephropathol**, v. 4, n. 2, p. 32–37, 2015.

BABU, S. K. et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) autoregulates its expression and induces adhesion molecule expression in asthma. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 140, n. 1, p. 18–25, 2011.

BAINES, K. J. et al. Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 127, n. 1, p. 153–160, 2011.

BALKWILL, F. TNF-  $\alpha$  in promotion and progression of cancer. **Cancer metastasis Rev**, v. 25, n. 3, p. 409–416, 2006.

BARLETTA, K. E.; LEY, K.; MEHRAD, B. Regulation of neutrophil function by adenosine. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 4, p. 856–864, 2012.

BECKETT, E. L. et al. A new short-term mouse model of chronic obstructive pulmonary disease identifies a role for mast cell tryptase in pathogenesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 3, p. 752–762, 2013.

BHATTACHARYYA, S.; DUDEJA, P. K.; TOBACMAN, J. K. Carrageenan-induced NF- $\kappa$ B activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1780, n. 7-8, p. 973–982, 2008.

BOHLMANN, F. et al. Heliangolides, and nerolidol and p-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 7, p. 1643–1647, 1981.

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

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

BORSELLINO, G. et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1225–1233, 2015.

BORTHAKUR, A. et al. Prolongation of carrageenan-induced inflammation in human colonic epithelial cells by activation of an NF $\kappa$ B-BCL10 loop. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 8, p. 1300–1307, 2012.

BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358–404, 2006.

BRUIJNZEEL, P. L. B.; UDDIN, M.; KOENDERMAN, L. Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 98, n. 4, p. 549–556, 2015.

BUFALO, M. C. et al. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- $\kappa$ B and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 84–92, 2013.

BULLENS, D. M. A et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? **Respiratory research**, v. 7, n. 1, p. 135–143, 2006.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131–134, 2005.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR., J. M. The Drug Development in Brazil: Challenges. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98–106, 2008.

CATAL, F. et al. A human monoclonal anti-TNF alpha antibody (adalimumab) reduces airway inflammation and ameliorates lung histology in a murine model of acute asthma. **Allergologia et immunopathologia**, v. 43, n. 1, p. 14–18, 2014.

CHANG, Y. et al. TH17 cytokines induce human airway smooth muscle cell migration. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 127, n. 4, p. 1046–1053, 2011.

CHAVALI, B. et al. ESR and X-ray Structure Investigations on the Binding and Mechanism of Inhibition of the Native State of Myeloperoxidase with Low Molecular Weight Fragments. **Applied magnetic resonance**, v. 46, n. 8, p. 853–873, 2015.

CHEN, H.-L. et al. Ethyl pyruvate protects rats from phosgene-induced pulmonary edema by inhibiting cyclooxygenase2 and inducible nitric oxide synthase expression. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 71–77, 2013.

CHEN, X. et al. The anti-inflammatory activities of *Ainsliaea fragrans* Champ. extract and its components in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages through inhibition of NF- $\kappa$ B pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 170, p. 72–80, 2015.

CHUNG, K. F. Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease. **Curr Drug Targets**, v. 7, n. 6, p. 675–681, 2006.

CHURG, A. et al. The role of interleukin-1beta in murine cigarette smoke-induced emphysema and small airway remodeling. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 40, n. 4, p. 482–490, 2009.

CLIFFORD, M. N. et al. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900–2911, 2003.

CLIFFORD, M. N. et al. Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal chrysanthemum by LC-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 929–936, 2007.

CLIFFORD, M. N. et al. LC-MSn analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 379–385, 2008.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3821–3832, 2005.

CONAGHAN, P. G. A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. **Rheumatology International**, v. 32, n. 6, p. 1491–1502, 2012.

CORDELL, G. A.; COLVARD, M. D. Natural products and traditional medicine: Turning on a paradigm. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 514–525, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CUZZOCREA, S. et al. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 3, p. 450–459, 1998.

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

DE SOUZA, R. R. et al. Modulatory effect of *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less. in a murine model of inflammation induced by carrageenan into the pleural cavity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 373–379, 2015.

DELPORTE, C. et al. Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase in inflammatory pathways and clinical studies. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

DORWARD, D. A. et al. Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 135, n. 2, p. 182–199, 2012.

DULEK, D. E.; PEEBLES, R. S. Viruses and asthma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 1080–1090, 2011.

EBAID, H. Neutrophil depletion in the early inflammatory phase delayed cutaneous wound healing in older rats: improvements due to the use of un-denatured camel whey protein. **Diagnostic pathology**, v. 9, n. 1, p. 46–57, 2014.

EKBERG-JANSSON, A. et al. Neutrophil-associated activation markers in healthy smokers relates to a fall in DLCO and to emphysematous changes on high resolution CT. **Respiratory Medicine**, v. 95, n. 5, p. 363–373, 2001.

EL KASMI, K. C.; STENMARK, K. R. Contribution of metabolic reprogramming to macrophage plasticity and function. **Seminars in immunology**, v. 27, n. 4, p. 267–275, 2015.

FARAGO, P. V. et al. Anatomia da folha e do caule de *Calea longifolia* (Asteraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 512–517, 2006.

FERRAZ, A. D. B. F. et al. Pharmacological and genotoxic evaluation of *Calea clematidea* and *Calea uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 858–862, 2009.

FLACH, A. et al. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. **Planta Med**, v. 68, n. 9, p. 836–838, 2002.

FRÖDE, T. S.; SOUZA, G. E. .; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, v. 13, n. 3, p. 162–168, 2001.

FUKUNAGA, J. et al. Comparative study to elucidate the mechanism underlying the difference in airway hyperresponsiveness between two mouse strains. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 1852–1861, 2007.

GDEK-MICHALSKA, A. et al. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 6, p. 1655–1662, 2013.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Adenosine deaminase: colorimetric method. **Methods of Enzymatic Analysis**, p. 315–323, 1984.

GÓMEZ, M.; GIL, J. F. Topical anti-inflammatory activity of *calea prunifolia* HBK (Asteraceae) in the TPA model of mouse ear inflammation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 12, p. 2391–2395, 2011.

GONGORA, L. et al. Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl-hydroquinone glucoside and quinic acid on leukocyte function. **Life Sciences**, v. 71, n. 25, p. 2995–3004, 2002.

GOODARZI, M. T. et al. Adenosine deaminase activity in COPD patients and healthy subjects. **Iranian journal of allergy, asthma, and immunology**, v. 9, n. 1, p. 7–12, 2010.

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

GRIFFIN, G. K. et al. IL-17 and TNF- $\alpha$  sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 12, p. 6287–99, 2012.

GUERRERO, M. F. et al. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 37–42, 2002.

GUEVARA, M. C. G.; GIRALDO, L. F. O.; VELANDIA, J. R. Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de *Myrcianthes leucoxila*, *Calea prunifolia*, *Curatella americana* Y *Physalis peruviana* en los modelos edema auricular por TPA, edema plantar por carragenina y artritis inducida por colágeno. **Biosalud**, v. 10, n. 1, p. 9–18, 2011.

HAN, E. H. et al. Inhibitory effect of 3-caffeoyl-4-dicaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* against phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in macrophages. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, n. 3, p. 397–404, 2010.

HASKÓ, G. et al. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 113, n. 2, p. 264–275, 2007.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. **Seminars in immunology**, v. 26, n. 3, p. 253–66, 2014.

HOLGATE, S. T. Cytokine and anti-cytokine therapy for the treatment of asthma and allergic disease. **Allergy International**, v. 53, n. 2, p. 47–54, 2004.

HONG, S.; JOO, T.; JHOO, J.-W. Antioxidant and anti-inflammatory activities of 3,5-dicaffeoylquinic acid isolated from *Ligularia fischeri* leaves. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 257–263, 2015.

HOSTETTER, S. J. Neutrophil Function in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 42, n. 1, p. 157–171, 2012.

IDRIS, A.; GHAZALI, N. B.; KOH, D. Interleukin 1  $\beta$  — A Potential Salivary Biomarker for Cancer Progression? **Biomarkers in cancer**, v. 7, p. 25–29, 2015.

ITO, K. et al. Histone deacetylase 2 – mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF- $\kappa$ B suppression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 1, p. 7–13, 2006.

IWAKURA, Y. et al. Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 149–162, 2011.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 3, p. 201–212, 2011.

KÖHLER, I. et al. In vitro antiplasmodial investigation of medicinal plants from El Salvador. **Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences**, v. 57, p. 277–281, 2002.

KONRAD, F. M. et al. Protective effects of pentoxifylline in pulmonary inflammation are adenosine receptor A2A dependent. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 27, n. 9, p. 3524–35, 2013.



KRENKE, R.; KORCZYŃSKI, P. Use of pleural fluid levels of adenosine deaminase and interferon gamma in the diagnosis of tuberculous pleuritis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 16, n. 4, p. 367–375, 2010.

LAMKANFI, M.; MALIREDDI, R. K. S.; KANNEGANTI, T. Fungal Zymosan and Mannan Activate the Cryopyrin. v. 284, n. 31, p. 20574–20581, 2009.

LANGER, H. F.; CHAVAKIS, T. Leukocyte - Endothelial interactions in inflammation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 7, p. 1211–1220, 2009.

LAROCK, C. N.; NIZET, V. Inflammasome/IL-1 $\beta$  responses to streptococcal pathogens. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 518, 2015.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. 1–10, 2009.

LEE, C. S. et al. 3,4,5-Tricaffeoylquinic acid inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated production of inflammatory mediators in keratinocytes via suppression of Akt- and NF- $\kappa$ B-pathways. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 11, p. 1715–23, 2011.

LEE, J. Y. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. **Tuberculosis and respiratory diseases**, v. 78, n. 2, p. 47–55, 2015.

LEE, K.-H. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. **Journal of natural products**, v. 73, n. 3, p. 500–16, 2010.

LEI, Y. et al. Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. **Asian pacif journal of cancer prevention**, v. 15, n. 20, p. 8539–8548, 2014.

LIMA, T. C. et al. Chromenes from leaves of *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. and evaluation of their leishmanicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 1, p. 7–10, 2015a.

LIMA, T. C. et al. Evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of phenolic compounds from *Calea uniflora* Less. **Natural Product Research**, v. 30, n. 5, p. 551–557, 2015b.

LINDSAY, J. et al. Risk factors for Alzheimer's disease: A prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, n. 5, p. 445–453, 2002.

LINUMA, M. et al. Sesquiterpenoid derivatives from *Calea* having adipocyte differentiation inhibitory effect. **U.S. Patent Application n. 12/049,647, 17 mar. 2008.**, 2003.

LORENC-KOCI, E.; CZARNECKA, A. Role of nitric oxide in the regulation of motor function. An overview of behavioral, biochemical and histological studies in animal models. **Pharmacological reports**, v. 65, n. 5, p. 1043–55, 2013.

LOWRY, O. H.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **Readings**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MAK, J. C. W. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 12, n. 4, p. 368–374, 2008.

MALDONADO, E.; MARQUEZ, C. L.; ORTEGA, A. A thymol derivative from *Calea nelsonii*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 7, p. 2527–2528, 1992.

MAO, K. et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. **Cell research**, v. 23, n. 2, p. 201–12, 2013.

MARCHETTI, G. M. et al. The anticancer activity of dichloromethane crude extract obtained from *Calea pinnatifida*. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 4, p. 157–162, 2012.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome. **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p. 417–426, 2002.

MATTILA, J. T.; THOMAS, A. C. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. 478, p. 270, 2014.

MCDUGALL, B. et al. Dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase. **Antimicrob Agents Ch**, v. 42, n. 1, p. 140–146, 1998.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

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

MERCER, P. F. et al. Translational models of lung disease. **Clinical Science**, v. 128, n. 4, p. 235–256, 2015.

MIOSSEC, P.; KOLLS, J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 10, p. 763–776, 2012.

MOHAMMED-ALI, Z.; CRUZ, G. L.; DICKHOUT, J. G. Crosstalk between the unfolded protein response and NF- $\kappa$ B-mediated inflammation in the progression of chronic kidney disease. **Journal of immunology research**, v. 2015, 2015.

MOLET, S. et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 3, p. 430–438, 2001.

MONDIN, C. A.; BRINGEL, J. B. A.; ROQUE, N. *Calea* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2013. Disponível em: <  
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB103756>>

MONTSEIRÍN, J. Neutrophils and asthma. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 19, n. 5, p. 340–354, 2009.

MORISHIMA, Y. et al. Th17-Associated Cytokines as a Therapeutic Target for Steroid-Insensitive Asthma. **Clinical and Development Immunology**, v. 2013, 2013.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. [s.l.: s.n.].

MULLANE, K.; WILLIAMS, M. Animal models of asthma: Reprise or reboot? **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 131–139, 2014.

NADEEM, A. et al. Enhanced airway reactivity and inflammation in A2A adenosine receptor-deficient allergic mice. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 292, n. 6, p. 1335–44, 2007.

NAKAMURA, K.; HAYASHI, H.; KUBOKAWA, M. Proinflammatory Cytokines and Potassium Channels in the Kidney. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

NASCIMENTO, A. M. DO et al. Chromanones with leishmanicidal activity from *Calea uniflora*. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 62, n. 5-6, p. 353–356, 2007.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, p. a006049, 2012.

NIE, J. et al. FOXP3+ Treg Cells and Gender Bias in Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 2015.

NOORT, A. R.; TAK, P. P.; TAS, S. W. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling in rheumatoid arthritis: Dr Jekyll and Mr Hyde? **Arthritis research & therapy**, v. 17, n. 15, p. 10.1186, 2015.

NUSSBAUM, C. et al. Myeloperoxidase: A Leukocyte-Derived Protagonist. **Antioxidants & Redox signaling**, v. 18, n. 6, p. 692–713, 2013.

OBER, A. G.; URBATSCH, L. E.; FISCHER, N. H. Germacranolides, calbertolides A, B and C, from *Calea berteriana*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1743–1745, 1985.

OLZA, J. et al. Myeloperoxidase is an early biomarker of inflammation and cardiovascular risk in prepubertal obese children. **Diabetes Care**, v. 35, n. 11, p. 2373–2376, 2012.

OMS. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine World Health Organization. **World Health Organization (WHO)**, p. 1 – 71, 2000.

OZAKI, E.; CAMPBELL, M.; DOYLE, S. L. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases : current perspectives. v. 8, p. 15–27, 2015.

PARK, K.-I. et al. Regulation of Proinflammatory Mediators via NF- $\kappa$ B and p38 MAPK-Dependent Mechanisms in RAW 264.7 Macrophages by Polyphenol Components Isolated from *Korea Lonicera japonica* THUNB. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2012, 2012.

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

PREDONZANI, A. et al. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. **World journal of Experimental Medicine**, v. 5, n. 2, p. 64–77, 2015.

PUANGPRAPHANT, S. et al. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- $\kappa$ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. 10, p. 1509–1522, 2011.

RANHEIM, T.; HALVORSEN, B. Coffee consumption and human health--beneficial or detrimental?--Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type

2 diabetes mellitus. **Molecular nutrition & food research**, v. 49, n. 3, p. 274–284, 2005.

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

RAO, T. S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723–741, 1993.

REUTERSHAN, J.; CAGNINA, R. E.; CHANG, D. Therapeutic Anti-Inflammatory Effects of Myeloid Cell Adenosine Receptor A2a Stimulation in LPS-Induced Lung Injury. **Journal of immunology**, v. 179, p. 1254–1263, 2007.

REVIE, D.; SALAHUDDIN, S. Z. Role of macrophages and monocytes in hepatitis C virus infections. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 11, p. 2777–2784, 2014.

REYNOLDS, C. Toll-like receptors 2 and 4 and innate immunity in neutrophilic asthma and idiopathic bronchiectasis. **Thorax**, v. 62, n. 3, p. 279, 2007.

RIBEIRO, V. L. S. et al. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2-4, p. 351–354, 2008.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, 2011.

ROMAGNY, S.; BETTAIEB, A. S-nitrosylation in TNF superfamily signaling pathway : Implication in cancer. **Redox biology**, v. 6, p. 507–515, 2015.

ROMÁN RAMOS, R. et al. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. **Archives of medical research**, v. 23, n. 1, p. 59–64, 1992.

ROQUE, N.; CARVALHO, V. C. Estudos taxonômicos do gênero *Calea* ( Asteraceae , Neurolaeneae ) no estado da Bahia , Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, n. 3, p. 547–561, 2011.

SAKAGUCHI, Y. et al. Effect of Combination of Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase Inhibitors on Carrageenan-Induced Pleurisy in Rats. **Life Science**, v. 79, n. 5, p. 442–447, 2006.

SALAZAR-MARTINEZ, E. et al. Coffee Consumption and Risk for Type 2 Diabetes Mellitus. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 1, p. 1–10, 2004.

SALEH, T. S. F.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 3, p. 811–819, 1996.

SATO, Y. et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1, p. 136–138, 2011.

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

SCHULIGA, M. NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1266–83, 2015.

SEGURA-COBOS, D. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the methanol extract of *Calea zacatechichi* leaves and its fractions. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 1100–1110, 2010.

SIMPSON, J. L. et al. Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma. **European Respiratory Journal**, v. 43, n. 4, p. 1067–1076, 2014.

SMYTH, E. M. et al. Prostanoids in health and disease. **Journal of lipid research**, v. 50, p. S423–S428, 2009.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 6, p. 427–439, 2010.

STEINBECK, C. et al. Identification of two chromenes from *Calea serrata* by Semiautomatic structure elucidation. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 6, p. 627–628, 1997.

SUKKAR, M. B. et al. asthma and COPD. **European Respiratory Journal**, v. 39, n. 3, p. 721–729, 2012.

TAKAO, K. et al. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 4, p. 1167–1172, 2015.

THOMAS, P. S.; HEYWOOD, G. Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. **Thorax**, v. 57, n. 9, p. 774–778, 2002.

TOURDOT, S. et al. Respiratory syncytial virus infection provokes airway remodelling in allergen-exposed mice in absence of prior allergen sensitization. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, n. 6, p. 1016–1024, 2008.

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

TSUTSUI, M. et al. Significance of nitric oxide synthases : Lessons from triple nitric oxide synthases null mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 127, n. 1, p. 42–52, 2015.

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



VANINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in cancer. **Redox biology**, v. 6, p. 334–343, 2015.

VAZQUEZ-TELLO, A et al. Induction of glucocorticoid receptor-beta expression in epithelial cells of asthmatic airways by T-helper type 17 cytokines. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 40, n. 9, p. 1312–1322, 2010.

VENDRELL, I. et al. Treatment of Cancer Pain by Targeting Cytokines. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

VENEGAS-FLORES, H.; SEGURA-COBOS, D.; VÁZQUEZ-CRUZ, B. Antiinflammatory Activity of the Aqueous Extract of *Calea zacatechichi*. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 45, p. 110–111, 2002.

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

WHITEHOUSE, M. W. Anti-inflammatory glucocorticoid drugs: Reflections after 60 years. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 1–19, 2011.

WILLIAMS, R. O.; PALEOLOG, E.; FELDMANN, M. Cytokine inhibitors in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. **Current opinion in pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 412–417, 2007.

WU, H. et al. Antileishmanial Germacranolides from *Calea zacatechichi*. **Planta medica**, v. 77, n. 7, p. 749–53, 2011.

WU, Q. et al. Antitussive, expectorant, and anti-inflammatory activities of four caffeoylquinic acids isolated from *Tussilago farfara*. **Pharmaceutical Biology**, p. 1–8, 2015.

XIA, Y.; SHEN, S.; VERMA, I. M. NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. **Cancer immunology research**, v. 2, n. 9, p. 823–30, 2014.

XU, N.; LI, X.; ZHONG, Y. Inflammatory cytokines: potential biomarkers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

YANG, Y. et al. Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 13, 2014.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell research**, v. 15, n. 1, p. 11–18, 2005.

ZHENG, Z. et al. The therapeutic detoxification of chlorogenic acid against acetaminophen-induced liver injury by ameliorating hepatic inflammation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 238, p. 93–101, 2015.

## APÊNDICE – Trabalhos desenvolvidos

### Artigo submetido:

The screenshot shows the Editorial Manager interface for Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. The header includes navigation links like HOME, LOGIN, HELP, REGISTER, UPDATE MY INFORMATION, JOURNAL OVERVIEW, MANUSCRIPTS, CONTACT US, SUBMIT A MANUSCRIPT, and INSTRUCTIONS FOR AUTHORS. The user is logged in as 'Tânia Fróde' with the username 'taniafróde'.

The main content area is titled 'Submissions Being Processed for Author Tânia Sílvia Fróde, ph.D.' and shows 'Page: 1 of 1 (1 total submissions)'. A table lists the submission details:

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission View Reference Checking Results	NSAP-D-16-00051	Systemic administration of <i>Calea pinnatifida</i> inhibits inflammation-induced by carrageenan in a murine model of pulmonary neutrophilia	03/04/2016	03/04/2016	Submitted to Journal

At the bottom, there is a link for '<< Author Main Menu'.

### Resumos apresentados em anais de congressos:

**FACCHIN, B. M. C.;** Moon, Y. J. K.; LUZ, A. B. G.; LIMA, T. C.; BIAVATTI, M. V.; FRÖDE, T. S. Estudo do efeito anti-inflamatório da *Calea pinnatifida* (R.Br) Less. utilizando o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. 2015. In: XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2015, São Paulo-SP. XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2015.



## ANEXO – Trabalhos em parceria

FRÖDE, T.S.; ROSA, J. S.; **FACCHIN, B. M. C.**; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G. Evidence of anti-inflammatory effects of *Rosmarinus officinalis* L. in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. In: AACC - Annual Meeting & Clinical Lab Expo 2012, Los Angeles. AACC - Annual Meeting & Clinical Lab Expo 2012, v. 1. p. 14-14.

FRÖDE, T. S.; VIGIL, S. V. G.; **FACCHIN, B. M. C.**; LUZ, A. B. G.; BASI, C. F.; ROSA, D. W., BIAVATTI, M. V. Evidence of the anti-inflammatory properties of *Ageratum conyzoides* L. in a murine model of pleurisy induced by carrageenan. In: Annual Meeting & Clinical Lab Expo - AACC, 2014, Chicago, IL. Annual Meeting & Clinical Lab Expo - AACC, 2014.

**FACCHIN, B. M. C.** Estudo do efeito anti-inflamatório da *Rosmarinus officinalis* L. em experimentos *in vivo*. In: 22º Seminário de Iniciação Científica da UFSC, Florianópolis, 2012.

**FACCHIN, B. M. C.** Estudo do efeito anti-inflamatório da *Rosmarinus officinalis* L. no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. In: 21º Seminário de Iniciação Científica da UFSC, Florianópolis, 2011.

ROSA, J. S.; **FACCHIN, B. M. C.**; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, T.S. Evidence of anti-inflammatory effects *Rosmarinus officinalis* L. *in vivo* experiments.. In: XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2012, Campos do Jordão. XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2012.

ROSA, J. S.; **FACCHIN, B. M. C.**; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, T.S. ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF *Rosmarinus officinalis* L. IN A MURINE MODEL OF PLEURISY INDUCED CARRAGEENAN. In: Sociedade Brasileira de Imunologia, 2011, Foz do Iguaçu. Sociedade Brasileira de Imunologia, 2011.

ROSA, J. S.; **FACCHIN, B. M. C.**; BASTOS, J.; Dalmarco, E. M.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, T.S. Evaluation of anti-inflammatory properties of crude extract oil free and isolated compound: Rosmarinic

Acid from *Rosmarinus officinalis* L. in vivo experiments. In: 11th world congress on inflammation and XXXVIII congress of brazilian society of immunology, 2013, Natal, RN. Immunopharmacology, 2013.

VIGIL, S. V. G.; **FACCHIN, B. M. C.** ; LUZ, A. B. G.; BOSI, C. F.; ROSA, D. W.; BIAVATTI, M. W.; FRÖDE, T.S. Evidence of anti-inflammatory properties of *Ageratum conyzoides* L. in the murine model of pleurisy induced by carrageenan. In: 11th world congress on inflammation and XXXVIII congress of brazilian society of immunology, 2013, Natal, RN. Immunopharmacology, 2013.

**FACCHIN, B. M. C.**; ROSA, J. S.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, T. S. Estudo do efeito anti-inflamatório da *Rosmarinus officinalis* L. utilizando-se o modelo de inflamação induzido por carragenina, em camundongos. In: 2º Congresso Paranaense de Ciências Biomédicas, Londrina, 2012.

### Artigos em parceria publicados:

DA ROSA, JULIA ; **FACCHIN, BRUNO** ; BASTOS, JULIANA ; SIQUEIRA, MARIANA ; MICKE, GUSTAVO ; DALMARCO, EDUARDO ; PIZZOLATTI, MOACIR ; FRÖDE, TÂNIA . Systemic Administration of *Rosmarinus officinalis* Attenuates the Inflammatory Response Induced by Carrageenan in the Mouse Model of Pleurisy. *Planta Medica*, v. 79, p. 1605-1614, 2013.

### Artigos em parceria submetidos:

International Immunopharmacology

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: edalmarco@gmail.com  
Switch To: Author

Version: EES 2016

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

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

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

