

Silvana Virginia Gagliotti Vigil de Mello

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA
Ageratum conyzoides L., SUAS FRAÇÕES E COMPOSTOS
ISOLADOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Tânia Silvia Fröde

Florianópolis
2016

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

Vigil de Mello, Silvana
ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *Ageratum
conyzoides* L., SUAS FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS / Silvana
Vigil de Mello ; orientadora, Tânia Silvia Frêde -
Florianópolis, SC, 2016.
148 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Plantas medicinais. 3. Estudo do efeito
anti-inflamatório. 4. Pleurisia. 5. Mediadores da
inflamação. I. Frêde, Tânia Silvia. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.
III. Título.

Silvana Virginia Gagliotti Vigil de Mello

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA
Ageratum conyzoides L., SUAS FRAÇÕES E COMPOSTOS
ISOLADOS**

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do Título de “Doutor em Farmácia”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Florianópolis, 16 de dezembro de 2016.

Prof^ª. Dra. Tania Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^ª Dra. Ariane Zamoner P. de Souza (UFSC- Membro Titular)

Prof^ª Dra. Celia Regina Monte Barardi (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva (UFSC – Membro Titular)

Prof^ª Dra. Márcia Maria de Souza (UNIVALI – Membro Titular)

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza (UFRJ – Membro Titular)

Prof^ª Dra. Tânia Sílvia Fröde (UFSC – Orientadora)

Dedico este trabalho a meus pais, José Luiz e Maria Inés, e a meu marido Carlos César, por todo amor e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PPGFAR) pela oportunidade de realizar o doutorado. Agradeço especialmente a coordenadora do PPGFAR, Prof^a Dra. Tânia B. C. Pasa.

A CAPES, pela bolsa de estudos.

À Prof^a Dra. Tânia Silvia Fröde, pela orientação.

À Prof^a Dra. Maique Weber Biavatti e suas alunas Daniela W. Rosa e Cristiane Fracari Bosi por me cederem o extrato bruto, frações e compostos isolados da planta estudada.

A todos meus colegas de laboratório, que estiveram ao meu lado ao longo desses anos. Agradecimento especial à Julia Salvan da Rosa, pela amizade, parceria e apoio em todas as horas.

Às minhas amigas María José Molinari e Rosana Alves Hermans Lima pela inestimável amizade e incentivo.

À minha família: meus pais José Luiz F. Vigil e Maria Inés G. de Vigil, meus irmãos Anna Karenina G. Vigil e Martín A. G. Vigil e minha avó Teresa Alvarez, por acreditarem em mim, por todo amor, apoio e compreensão. Aos meus sogros, Carlos César de Mello Neto e Denise T. de Mello, às minhas cunhadas Bruna T. de Mello e Juliana Cavalli e ao meu concunhado José Rennan Mesquita, pelo apoio e carinho. Agradeço especialmente ao meu esposo Carlos César de Mello Júnior por todo amor, incentivo, apoio e compreensão.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem, ou que seus planos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém...
Confie em si mesmo.
Quem acredita sempre alcança.”

(Renato Russo)

RESUMO

Ageratum conyzoides L. é utilizada na medicina popular brasileira como agente anti-inflamatório. Os objetivos deste estudo foram: I) Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto (EB), das frações: etanol (EtOH-F), hexano (HEX-F), acetato de etila (AcOEt-F) e diclorometano (DCM-F) e dos compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB), 1,2-benzopirona (BP) e eupalestina (EP) da *A. conyzoides* L.; II) Elaborar uma revisão sistemática sobre o efeito anti-inflamatório das cumarinas (*in vitro* e *in vivo*). Neste estudo, foi utilizado o modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Os parâmetros analisados foram: leucócitos, concentrações de: proteínas do exsudato, mieloperoxidase (MPO), adenosina desaminase (ADA), metabólitos do óxido nítrico (NOx) e citocinas (IL-10, IL-17A, IL-6, TNF- α , IFN- γ , MCP-1) e fosforilação de p65 NF- κ B (p-p65 NF- κ B), p38 MAPK (p38 e p-p38 MAPK) e ERK (p-ERK). Para revisão sistemática, foi realizada a pesquisa de literatura publicada entre 01/01/2005 e 31/12/2015, nas bases de dados PUBMED, MEDLINE, Web of Science e Scopus, utilizando os termos 'anti-inflammatory' e 'coumarin' e 'in vivo' ou 'in vitro'. EB, frações e compostos isolados inibiram leucócitos, as concentrações de proteínas do exsudato de MPO, ADA e NOx ($p < 0,05$). EB, EtOH-F e os compostos isolados inibiram as concentrações de IL-17A, IL-6, TNF- α e IFN- γ ($p < 0,05$). EB, EtOH-F, MeONOB e BP reduziram as concentrações de MCP-1 ($p < 0,01$). EB, EtOH-F e BP aumentaram as concentrações de IL-10 ($p < 0,05$). Os compostos isolados inibiram p-p65 NF- κ B e p-p38 MAPK ($p < 0,01$). Em relação à revisão sistemática, a maioria dos estudos utilizou ensaios *in vitro*. Os estudos avaliaram principalmente citocinas, edema, estresse oxidativo, células inflamatórias, NOx, NF- κ B, MAPK, MPO e COX-2. *A. conyzoides* L. possui importante atividade anti-inflamatória e seu mecanismo de ação parece estar associado à inibição da fosforilação de p65 NF- κ B e p38 MAPK. Os compostos isolados MeONOB, BP e EP e as cumarinas podem ser considerados importantes candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios.

Palavras-chaves: *Ageratum conyzoides* L., inflamação, mediadores pró-inflamatórios, NF- κ B, MAPK, cumarinas.

ABSTRACT

Ageratum conyzoides L. is used in Brazilian folk medicine as an anti-inflammatory agent. The aims of this study were: I) Evaluate the anti-inflammatory effect of the crude extract (CE), of the fractions: ethanol (EtOH-F), hexane (HEX-F), ethyl acetate (EtOAc-F) and dichloromethane (DCM-F) and of the isolated compounds 5'-methoxy nobiletin (MeONOB), 1,2-benzopyrone (BP) and eupalestin (EP) from *A. conyzoides* L.; II) Make a systematic review about the anti-inflammatory properties of coumarins (*in vitro* and *in vivo*). In this study, the model of pleurisy induced by carrageenan was used, in mice. The parameters analysed were: leukocytes, concentrations of the exudate protein, of myeloperoxidase (MPO), of adenosine deaminase (ADA) and of nitric oxide metabolites (NOx), cytokines levels (IL-10, IL-17A, IL-6, TNF- α , IFN- γ , MCP-1), and phosphorylation of p65 NF- κ B (p-NF- κ B p65), p38 MAPK (p38 and p-p38 MAPK) and ERK (p-ERK). For the systematic review, it was carried out the research of literature published between January 1, 2005 and December 31, 2015, in PUBMED, MEDLINE, Web of Science and Scopus using the keywords: 'anti-inflammatory' and 'coumarin' and '*in vivo*' or '*in vitro*'. CE, fractions and isolated compounds inhibited leukocyte, protein concentrations of the exudate, MPO, ADA and NOx concentrations ($p < 0.05$). CE, EtOH-F and isolated compounds significantly reduced IL-17A, IL-6, TNF- α and IFN- γ levels ($p < 0.05$). CE, EtOH-F, MeONOB and BP significantly reduced MCP-1 levels ($p < 0.01$). CE, EtOH-F and BP increased IL-10 levels ($p < 0.05$). The isolated compounds reduced p-p65 NF- κ B and p-p38 MAPK ($p < 0.01$). In relation to the systematic review, most of the studies used *in vitro* assays. The studies focused mainly in cytokines, oedema, oxidative stress, inflammatory cells, NOx, NF- κ B, MAPK, MPO, and COX-2. *A. conyzoides* L. has important anti-inflammatory activity and its mechanism of action seems to be associated with the inhibition of phosphorylation of p65 NF- κ B and p-p38 MAPK. The isolated compounds MeONOB, BP and EP and coumarins may be considered important candidates for the development of new anti-inflammatory drugs.

Key words: *Ageratum conyzoides* L., inflammation, pro-inflammatory mediators, NF- κ B, MAPK, coumarins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem de <i>Ageratum conyzoides</i> Linn	27
Figura 2 - Perfil temporal do modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	45
Figura 3 - Esquema de extração do extrato bruto, das frações e dos compostos isolados a partir das partes aéreas da <i>A. conyzoides</i> L.....	50
Figura 4 - A) Composto isolado 5'-metoxi nobiletina (MeONOB); B) composto isolado 1,2-benzopirona (BP); C) composto isolado eupalestina (EP) identificados por ressonância nuclear magnética.....	51
Figura 5 - Protocolo experimental para análise da curva dose-resposta utilizando o modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	55
Figura 6 - Protocolo experimental para análise da curva tempo-resposta utilizando o modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	56
Figura 7 – Efeito do extrato bruto (10-200 mg/kg, i.p.) da <i>A. conyzoides</i> L., administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a concentração de proteínas do exsudato e o influxo de leucócitos.....	68
Figura 8 - Efeito da fração etanol (EtOH-F: 5-25 mg/kg, i.p.) da <i>A. conyzoides</i> L., administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a concentração das proteínas do exsudato e o influxo de leucócitos.....	69
Figura 9 - Efeito da fração hexano (HEX-F: 10-50 mg/kg, i.p.) da <i>A. conyzoides</i> L., administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a concentração das proteínas do exsudato e o influxo de leucócitos.....	70
Figura 10 - Efeito da fração acetato de etila (AcOEt-F: 10-50 mg/kg, i.p.) da <i>A. conyzoides</i> L., administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a concentração das proteínas do exsudato e o influxo de leucócitos.....	71
Figura 11 - Efeito da fração diclorometano (DCM-F: 10-50 mg/kg, i.p.) da <i>A. conyzoides</i> L., administrada 0,5 h antes da indução da	

pleurisia pela carragenina, sobre a concentração das proteínas do exsudato e o influxo de leucócitos.....	72
Figura 12 - Efeito do extrato bruto (50 mg/kg, i.p.) da <i>A. conyzoides</i> L., administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina sobre as concentrações de A) mieloperoxidase (MPO); B) adenosina desaminase (ADA); e C) metabólitos do óxido nítrico (NOx).....	73
Figura 13 - Efeito das frações hexano (HEX-F: 50 mg/kg), acetato de etila (AcOEt-F: 50 mg/kg), diclorometano (DCM-F: 50 mg/kg) e etanol (EtOH-F: 10 mg/kg) da <i>A. conyzoides</i> L., administradas 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina sobre as concentrações de A) mieloperoxidase (MPO); B) adenosina desaminase (ADA), e C) metabólitos do óxido nítrico (NOx).....	74
Figura 14 - Efeito dos compostos isolados da <i>A. conyzoides</i> L. 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg), administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina sobre as concentrações de A) mieloperoxidase (MPO); B) adenosina desaminase (ADA), e C) metabólitos do óxido nítrico (NOx).....	75
Figura 15 - Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg, i.p), fração etanol (EtOH-F: 10 mg/kg, i.p.) e compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg) da <i>A. conyzoides</i> L., administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre as concentrações de A) IL-17A; e B) IL-6.....	76
Figura 16 - Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg, i.p), fração etanol (EtOH-F: 10 mg/kg, i.p.) e compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg) da <i>A. conyzoides</i> L., administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre as concentrações de A) TNF- α ; e B) IFN- γ	77
Figura 17 - Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg, i.p), fração etanol (EtOH-F: 10 mg/kg, i.p.) e compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg) da <i>A. conyzoides</i> L., administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre as concentrações de A) MCP-1; e B) IL-10.....	78

Figura 18 - Efeito dos compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg) da <i>A. conyzoides</i> L., administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a fosforilação da subunidade p65 de NF-κB.....	79
Figura 19 - Efeito dos compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg) da <i>A. conyzoides</i> L., administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a fosforilação de: A) p38 MAPK total; e B) p38 MAPK fosforilada.	80
Figura 20 - Efeito dos compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg) da <i>A. conyzoides</i> L., administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a fosforilação ERK fosforilada.....	81
Figura 21 – Protocolo de triagem para seleção dos estudos incluídos na revisão sistemática sobre o efeito anti-inflamatório das cumarinas.....	83
Figura 22 - Proposta de mecanismo de ação anti-inflamatória da <i>A. conyzoides</i> L., no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	111
Figura 23 - Proposta de mecanismo de ação anti-inflamatória das cumarinas.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS

5-LOX	Lipoxigenases
<i>A. conyzoides</i> L.	<i>Ageratum conyzoides</i> L.
A _{1/2A/2B/3}	Receptor A ₁ , A _{2A} , A _{2B} ou A ₃ de adenosina
AcOEt-F	Fração acetato de etila
ADA	Adenosina-desaminase
AP-1	Proteína ativadora-1
APC	Células apresentadoras de antígeno
ATF	Fator de ativação de transcrição
BAFF	Receptor de fator ativador de células B
Bcl10	Leucemia/linfoma de células B
BP	1,2-Benzopirona
Breg	Células B regulatórias
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCL	Quimiocina C-C ligante
CD	Molécula co-estimuladora <i>Cluster of Differentiation</i>
CEUA	Comitê de ética do uso de animais
Cg	Carragenina
COX	Ciclooxigenase
CXCL	Quimiocina C-X-C ligante
DCM-F	Sub-fração diclorometano
Dexa	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
EB	Extrato bruto
ELISA	Enzimaimunoensaio
EP	Eupalestina
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EtOH-F	Fração etanol
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto
FLAP	Proteína ativadora de 5-LOX
Foxp3	Forkhead box P3
Fyn	Proteína tirosina cinase da família Src
HEX-F	Fração hexano
i.p.	Via intraperitoneal
i.pl.	Via intrapleurar
i.v.	Via intravenosa
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN-γ	Interferon gama

Ig	Imunoglobulina
IKK	Complexo da cinase I κ B
IL	Interleucina
IL-1Ra	Antagonista do receptor de interleucina-1
IRF-3	Fator regulatório de interferon 3
I κ B α / β	Inibidor de NF- κ B tipo α / β
JAK	Janus cinase
JNK	Cinases c-Jun N-terminal
Lck	Proteína tirosina cinase específica de linfócito
LPS	Lipopolissacarídeos
LT	Leucotrieno
LT β R	Linfotoxina β
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MAPKK	Proteína cinase cinase ativada por mitógeno
MAPKKK	Proteína cinase cinase cinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito-1
MEC	Matriz extracelular
MeONOB	5'-metoxi nobiletina
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade tipo II
MIP	Proteína inflamatória de macrófago
MKP-1	Proteína cinase fosfatase-1 ativada por mitógenos
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
Myd88	Fator de diferenciação mieloide 88
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NMR	Ressonância magnética nuclear
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOx	Metabólitos do óxido nítrico (nitrito/nitrato)
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
OMS	Organização Mundial da Saúde

PE	Ficoeritrina
PG	Prostaglandina
PKC	Proteína cinase C
RANK	Receptor ativador de NF- κ B
Rel	Membro da família NF- κ B
ROR γ t	Fator de transcrição órfão gama relacionado ao ácido retinoico
STAT	Sinal transdutor e ativador de transcrição
SUS	Sistema único de saúde
TAK-1	TGF- β cinase ativada-1
TGF β	Fator de crescimento transformante β
Th1/2/17	Linfócito T helper 1/2/17
TLR4	Receptor tipo <i>toll</i> 4
TNFAIP	Proteína induzida por TNF
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF	Fator associado ao receptor de fator de necrose tumoral
TRAM	Molécula adaptadora relacionada ao TRIF
Treg	Células T reguladoras
TRIF	Adaptador contendo domínio <i>Toll</i> /IL-1R induzido por interferon- β
TX	Tromboxano
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
VEGF	Fator de crescimento endotelial
Zap-70	Proteína cinase associada a cadeia zeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA SAÚDE	25
1.2 <i>AGERATUM CONYZOIDES</i> L.	27
1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO	29
1.4 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS ESTEROIDAIIS OU GLICOCORTICOIDES	41
1.5 MODELOS DE INFLAMAÇÃO	43
1.6 HIPÓTESE	47
2. OBJETIVOS	47
2.1 OBJETIVO GERAL	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
3. METODOLOGIA	49
ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO	49
3.1 MATERIAL VEGETAL	49
3.1.1 Coleta do material vegetal	49
3.1.2 Obtenção do extrato do bruto, frações e compostos isolados da <i>A. conyzoides</i> L.	49
3.2 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	51
3.2.1 Animais	51
3.2.2 Procedimento anestésico	51
3.2.3 Eutanásia dos animais	52
3.2.4 Pleurisia induzida pela carragenina em camundongos ..	52
3.2.5 Protocolo experimental	53
3.3 TÉCNICAS UTILIZADAS NOS ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	54
3.3.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos	54
3.3.2 Determinação da concentração das proteínas do exsudato	56
3.3.3 Determinação da concentração da mieloperoxidase	57
3.3.4 Determinação da concentração da adenosina desaminase	58
3.3.5 Quantificação dos metabólitos do óxido nítrico	58
3.3.6 Determinação das concentrações de IL-17A, IL-6, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 e IL-10	59
3.3.7 Avaliação da fosforilação de p65 (p-p65 NF- κ B)	60
3.3.8 Avaliação da fosforilação de p38 MAPK	61
3.3.9 Avaliação da fosforilação de ERK (MAPK)	62
3.4 ELABORAÇÃO DA REVISÃO SISTEMÁTICA	62

3.4.1	Estratégia de pesquisa	62
3.4.2	Pesquisa de dados	62
3.4.3	Seleção dos estudos.....	63
4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
5.	RESULTADOS.....	65
5.1	RESULTADOS OBTIDOS NOS ESTUDOS <i>IN VIVO</i> PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO.....	65
5.1.1	Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>A. conyzoides</i> L. sobre a migração de leucócitos e a concentração das proteínas do exsudato	65
5.1.2	Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>A. conyzoides</i> L. sobre as concentrações de MPO, ADA e NOx	66
5.1.3	Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>A. conyzoides</i> L. sobre as concentrações das citocinas IL-17A, IL-6, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 E IL-10	66
5.1.4	Efeito dos compostos isolados da <i>A. conyzoides</i> L. 5'-metoxi nobiletina, 1,2-benzopirona e eupalestina sobre a fosforilação de p65 (NF- κ B), p38 MAPK e ERK.....	66
5.2	RESULTADOS OBTIDOS NA REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DAS CUMARINAS.	82
5.2.1	Estudos incluídos na revisão sistemática.....	82
5.2.2	Toxicidade das cumarinas	82
5.2.3	Ensaio <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	82
5.2.4	Cumarinas e a resposta anti-inflamatória.....	85
5.2.5	Cumarinas e a inibição de outros mediadores da inflamação	87
5.2.6	Cumarinas e a inibição das vias de sinalização da resposta inflamatória.....	90
5.2.7	Cumarinas e outros fatores de transcrição.....	91
6.	DISCUSSÃO.....	101
7.	CONCLUSÃO	109
8.	REFERÊNCIAS	113

1. INTRODUÇÃO

1.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA SAÚDE

O campo das práticas integrativas e complementares contempla sistemas médicos e recursos terapêuticos, os quais são também denominados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de medicina tradicional e complementar/alternativa. Tais sistemas e recursos envolvem abordagens que buscam estimular os mecanismos naturais de prevenção de agravos e recuperação da saúde por meios eficazes e seguros, com ênfase na escuta acolhedora, no desenvolvimento do vínculo terapêutico e na integração do ser humano com o meio ambiente e a sociedade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Dentre as diferentes medicinas tradicionais, pode-se destacar a medicina tradicional indiana e a chinesa. A medicina tradicional indiana é uma das mais antigas ciências da saúde e é baseada em seis sistemas: naturopatia, unani, siddha, homeopatia, yoga e ayurveda, sendo esta última a prática medicinal indiana mais antiga, difundida e aceita no mundo (JAISWAL; LIANG; ZHAO, 2016). Já a medicina tradicional chinesa é um sistema milenar que inclui a acupuntura, práticas corporais como tai-chi-chuan, e práticas mentais como a meditação (ZHANG et al., 2012a; CHUNG et al., 2014). A prática da medicina tradicional chinesa e da ayurveda tem em comum seu principal material medicinal: as plantas medicinais.

O uso de plantas medicinais remonta às primeiras civilizações. A evidência escrita mais antiga data de mais de 5.000 anos e foi encontrada em Nagpur, na Índia. Trata-se do registro em tabuletas cuneiformes de 12 preparações medicinais que fazem referência a mais de 250 plantas diferentes (PETROVSKA, 2012).

No Brasil, a utilização de espécies vegetais bioativas é anterior ao Período Colonial, e integrava as práticas tradicionais das diversas nações indígenas. Desde então, ao longo da história, a medicina popular brasileira se construiu fundamentada não só em conhecimentos indígenas, mas também no conhecimento do imigrante europeu e africano (ROCHA et al., 2015).

Nas décadas de 1940 e 1950, mesmo com o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permaneceram como forma alternativa de tratamento de enfermidades em várias partes do mundo, mas foi nas últimas décadas do século XX que se observou a “redescoberta” de preparações à base de plantas para fins terapêuticos (BADKE et al., 2012).

Atualmente, muitos fatores têm contribuído para o aumento da utilização das plantas como recurso medicinal, entre eles, o alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência ao uso de produtos de origem natural. Acredita-se, que o cuidado realizado por meio das plantas medicinais seja favorável à saúde humana, desde que o usuário tenha conhecimento prévio de sua finalidade, riscos e benefícios (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013; ROCHA et al., 2015).

A legitimação e a institucionalização de abordagens de atenção à saúde, voltadas para a medicina tradicional no Brasil, teve início a partir da década de 1980, principalmente após a criação do Sistema Único de Saúde (SUS). Mais tarde, foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, instituída pela Portaria do Ministério da Saúde nº 971, de 03 de maio de 2006, tendo como objetivo ampliar as opções terapêuticas aos usuários do SUS, dentre estas, as plantas medicinais, com garantia de acesso aos fitoterápicos e a serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde. Somando-se a isso, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, instituído em 2007, visava "garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional" (BADKE et al., 2012; ROCHA et al., 2015)

Neste cenário, o Brasil, que é o país de maior biodiversidade do planeta, tem o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas de novas opções terapêuticas.

1.2 AGERATUM CONYZOIDES L.

A *Ageratum conyzoides* Linn (*A. conyzoides* L.) (Figura 1), conhecida popularmente como mentrasto, catinga de bode ou erva de São João, é uma espécie do gênero *Ageratum*, pertencente à família Asteraceae (LIMA et al., 2011).



Figura 1- Imagem de *Ageratum conyzoides* Linn

Fonte: <http://www.sweetpics.site/a/ageratum-conyzoides.html>.

Acesso em 12 de agosto de 2016.

A. conyzoides L. é uma planta tropical comum na África Ocidental, algumas partes da Ásia, América do Sul e América Central que é utilizada na medicina popular em muitos países, como Índia, Camarões, Congo, México, Ilhas do Caribe, dentre outros. É considerada uma erva anual cosmopolita tropical, muito comum nas áreas do nordeste do Brasil, especialmente em serras. Tem odor peculiar, sendo na Austrália, comparado ao odor de bode, daí o nome popular de catinga de bode (OKUNADE, 2002; AGRA et al., 2008).

Na medicina popular brasileira, a infusão das folhas *A. conyzoides* L. (2-3 g em 150 mL de água de duas a três vezes ao dia) é utilizada como anti-inflamatório e analgésico, para o tratamento de dores articulares que ocorrem na artrite e na artrose, e também como agente antidiarreico (OKUNADE, 2002;

SINGH et al., 2013; SILVA; FRANCISCONI; GONÇALVES, 2016).

Estudos *in vitro* e *in vivo*, bem como estudos clínicos, evidenciaram importantes propriedades farmacológicas desta planta, incluindo analgésica (YAMAMOTO et al., 1991), antimicrobiana (DURODOLA, 1977; ADETUTU et al., 2012), antiprotozoário (NOUR et al., 2010; UKWE et al., 2010; HAREL et al., 2011), antiproliferativa e antioxidante (ADEBAYO et al., 2010a), além de efeito anti-inflamatório (MOURA et al., 2005; BIRADAR et al., 2011; HASSAN et al., 2012).

A análise fitoquímica da *A. conyzoides* L. identificou a presença de diferentes constituintes: mono- e sesquiterpenos, benzofurano, cromonas, cromenos, cumarinas, flavonoides (euplanestina e nobiletina), alcaloides, triterpenos e esteroides (SINGH et al., 2013).

Por outro lado, a toxicidade desta planta ainda é pouco estudada. Estudos publicados reportaram a presença de alcaloides potencialmente hepatotóxicos, tais como os alcaloides pirrolizidínicos, na *A. conyzoides* L. (BOSI et al., 2013; ROEDER; WIEDENFELD, 2013; NEUMAN et al., 2015). Entretanto, estudos *in vivo* não observaram efeitos tóxicos, sugerindo que a *A. conyzoides* L. não oferece risco quando administrada via oral (MOURA et al., 2005; ADEBAYO et al., 2010b; DIALLO et al., 2010).

Apesar do uso consolidado da *A. conyzoides* L. na medicina popular e das propriedades farmacológicas publicadas, faltam estudos científicos que elucidem os alvos moleculares que contribuem para sua ação anti-inflamatória. Neste contexto, o estudo da atividade anti-inflamatória da *A. conyzoides* L. torna-se importante para o embasamento científico de seu uso medicinal, bem como para contribuir no desenvolvimento de novos fármacos com potencial ação anti-inflamatória.

Vale a pena ressaltar que um dos principais compostos isolados da *A. conyzoides* é uma cumarina simples (1,2-benzopirona).

As cumarinas são compostos orgânicos aromáticos heterocíclicos que representam uma importante classe de compostos fenólicos. Tais moléculas compreendem uma grande classe de compostos que são encontrados em todo o reino vegetal, principalmente em frutos, raízes, caule e folhas de

membros das famílias Apiaceae e Rutaceae (GARCÍA-BELTRÁN et al., 2014; WALASEK et al., 2015).

Essas moléculas têm suas estruturas provenientes de lactonas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico (2H-1-benzopiran-2-onas) e são classificadas em quatro subtipos, que ocorrem na natureza na forma de metabólitos secundários das plantas: I) cumarinas simples; II) furanocumarinas; III) piranocumarinas; e IV) piranocumarinas substituídas (ROHINI; SRIKUMAR, 2014; SKALICKA-WOŹNIAK et al., 2016).

Sabe-se que esta classe de compostos orgânicos, provenientes de fontes naturais ou sintéticas, possui diversas funções biológicas, além de propriedades farmacológicas. Na medicina, as cumarinas são utilizadas no tratamento de diferentes condições clínicas devido à sua atividade anticoagulante (LEI et al., 2015), antiproliferativa (LI et al., 2015; BAI et al., 2016), antioxidante (KANCHEVA et al., 2010; KARTHIKEYAN et al., 2016), e anti-inflamatória (OKUYAMA et al., 2013; SAHU et al., 2015; LIU et al., 2016; NGUYEN et al., 2016; WEI et al., 2016b).

Apesar da variedade de estudos químicos sobre sua estrutura, poucos foram conduzidos com foco na avaliação das propriedades farmacológica das cumarinas.

1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é uma resposta fisiológica desencadeada por lesão tecidual ou estímulos antigênicos e que, muitas vezes, torna-se prejudicial ao organismo. Este processo pode ser definido como uma cascata de eventos na qual ocorre a liberação de mediadores e a ativação de células que tem como objetivo o reparo do tecido lesado (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012; HEADLAND; NORLING, 2015).

As características clínicas do processo inflamatório já foram descritos há mais de 2.000 anos por Celsus e estão bem estabelecidas pelos sinais cardinais clássicos, como: calor, rubor, tumor e dor (DORWARD et al., 2012). Inicialmente, observa-se uma resposta de fase aguda, que possui duração variável, na qual há o aumento da permeabilidade vascular, expressão de moléculas de adesão, tais como selectinas, integrinas, molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula de adesão vascular

(VCAM-1), seguido pela adesão e infiltração de células no local da lesão, liberação de mediadores, apoptose celular e crescimento de novos tecidos e vasos (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012; HEADLAND; NORLING, 2015) Ainda, se a inflamação não for interrompida com êxito, ocorre a progressão da lesão tecidual devido à ativação celular exacerbada e a produção de mediadores inflamatórios, com posterior perda da atividade funcional do órgão afetado (DORWARD et al., 2012).

Na resposta inflamatória e na resposta imune inata, ocorre a ativação de células fagocíticas, dentre as quais se destacam os monócitos e os neutrófilos (JANG; RABB, 2015; ZHOU et al., 2015).

Os neutrófilos desempenham função protetora devido à sua capacidade de fagocitar e produzir importantes substâncias antimicrobianas, enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; LEMESCH et al., 2016). As proteínas presentes nos neutrófilos estão distribuídas em seus grânulos primários (azurófilos), secundários (específicos) e terciários, bem como em vesículas secretoras.

A mieloperoxidase (MPO) é uma peroxidase expressa principalmente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, mas também pode estar presente nos mononucleares (monócitos/macrófagos), porém em menor quantidade (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010; PROKOPOWICZ et al., 2012).

Além de sua participação na imunidade inata, a MPO também é importante na formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (*Neutrophil Extracellular Traps* – NETs), visto que foi observado que a deficiência desta enzima prejudica a formação de NETs (METZLER et al., 2011).

A atividade da MPO está relacionada principalmente com a atividade fagocítica dos neutrófilos. Concomitante com o processo de fagocitose, os neutrófilos ativam a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e recrutam seus grânulos para se fundirem com o fagossoma recém-formado. A NADPH oxidase transfere elétrons para dentro do fagossoma, gerando o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a partir de oxigênio molecular. O ânion cloreto (Cl^-), presente no citoplasma dos neutrófilos, entra no fagossoma através de canais de cloro, principalmente via proteína transmembrana denominada de Regulador de Condutância

Transmembrana da Fibrose Cística (CFTR - *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Outros canais de cloro, como os canais de cloreto dependente de voltagem 3 (ClC3) e os co-transportadores K^+/Cl^- 3 (KCC3), também promovem aporte de Cl^- , porém, em menor escala. Neste processo, a MPO, fornecida pelos grânulos azurófilos, reage com o H_2O_2 formando o Composto I (Cpd I), que por sua vez catalisa a oxidação dos dois elétrons do ânion Cl^- , formando o cátion Cl^+ . O cátion Cl^+ resultante desta reação é então utilizado para a formação do ácido hipocloroso (HOCl). O HOCl formado reage com peptídeos e proteínas do próprio hospedeiro e do microrganismo fagocitado gerando uma variedade de produtos, incluindo as monocloraminas (NH_2Cl) e os compostos cloroaminados (PNHCl). Estes produtos gerados na reação do HOCl podem ainda promover a formação de compostos aldeídicos, os quais, assim como o HOCl e seus derivados, tem potencial ação microbicida (KLEBANOFF et al., 2013).

No entanto, a ativação persistente do sistema MPO- H_2O_2 -HOCl durante o processo inflamatório faz com que a MPO seja liberada para o espaço extracelular podendo promover lesão tecidual. A lesão tecidual ocorre porque há produção de espécies reativas de oxigênio que são capazes de iniciar reações de oxidação em lipídeos, no DNA e em lipoproteínas (PROKOPOWICZ et al., 2012; KLEBANOFF et al., 2013).

Durante o processo inflamatório o acúmulo de neutrófilos é acompanhado pela intensa atividade da MPO, assim, a análise da atividade desta enzima torna-se uma ferramenta útil para a avaliação indireta da presença de neutrófilos ativados no sítio inflamatório.

Na clínica, o aumento da atividade da MPO pode ser detectado no endotélio coronariano de pacientes com aterosclerose (DE VRIES et al., 2016), no plasma de pacientes com doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla (TZIKAS et al., 2014; JUCAITE et al., 2015; RAY; KATYAL, 2016), e no soro de pacientes com artrite reumatoide (STAMP et al., 2012) e de pacientes asmáticos (NADEEM et al., 2014; CIEPIELA; OSTAFIN; DEMKOW, 2015).

Além dos neutrófilos, outras células importantes do sistema imune são monócitos. Durante o processo inflamatório, uma vez que migram para o tecido, os monócitos se diferenciam em

macrófagos, e estas células serão responsáveis por fagocitar corpos estranhos e promover a apresentação de antígenos para os linfócitos T, através do complexo proteico denominado complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II) (DAS et al., 2015). Além disso, os macrófagos ativados podem secretar citocinas pró-inflamatórias como: interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), contribuindo para o desenvolvimento do processo inflamatório (DAS et al., 2015, ITALIANI; BORASCHI, 2015).

Dentre os mediadores secretados pelos macrófagos, pode-se destacar outra importante enzima envolvida no processo inflamatório, a adenosina desaminase (ADA). Apesar de serem os macrófagos ativados a principal fonte de ADA, neutrófilos, linfócitos T e B e células endoteliais também secretam esta enzima no sítio inflamatório, regulando as concentrações plasmáticas de adenosina, que está associada diretamente com a resposta inflamatória (BEYAZIT et al., 2012; ANTONIOLI et al., 2014; CAORSI et al., 2016).

A ADA é uma enzima envolvida no metabolismo das purinas, que catalisa a desaminação hidrolítica da adenosina ou em inosina ou 2'-desoxiadenosina em 2'-desoxiinosina (ANTONIOLI et al., 2014; CORTÉS et al., 2015).

A ADA pode ser encontrada em diferentes tecidos e fluidos corporais. Inicialmente, sua função primordial é o controle das concentrações de adenosina, entretanto, sua atividade biológica não se limita a atividade enzimática. Sabe-se que a ADA participa da diferenciação e da proliferação de linfócitos T, bem como da maturação e da função dos monócitos e dos macrófagos (CAORSI et al., 2016).

Em humanos, foram identificadas duas isoformas de ADA, designadas de ADA1 e ADA2 (BEYAZIT et al., 2012; KALJAS et al., 2016). A isoforma ADA1 pode ser expressa por todos os tipos de células, enquanto a ADA2 é expressa principalmente por monócitos e outras células da linhagem mieloide. Em relação à atividade, a isoforma ADA1 atua principalmente no ambiente intracelular. Por outro lado, a isoforma ADA2 é secretada no microambiente, onde exerce suas funções, sendo assim facilmente detectada no plasma (CAORSI et al., 2016; KALJAS et al., 2016).

A avaliação da ADA2 no soro e demais fluidos biológicos auxilia o diagnóstico de condições patológicas, uma vez que a atividade desta enzima se encontra aumentada em pacientes com doenças inflamatórias, como artrite reumatoide (VINAPAMULA et al., 2015), lúpus eritomatoso sistêmico (SAGHIRI et al., 2012), colite ulcerativa (BEYAZIT et al., 2012) e tuberculose (IGE; EDEM; ARINOLA, 2016).

A adenosina, substrato da ADA, é um nucleosídeo endógeno presente tanto no espaço intra como extracelular, com ação pleiotrópica, que desempenha seus efeitos anti-inflamatórios (ação constitutiva) ou pró-inflamatórios, dependendo do tipo de receptor ativado e da sua concentração no sítio inflamatório (ANTONIOLI et al., 2014).

Os receptores de adenosina pertencem à família de receptores acoplados a proteína G e são classificados em quatro diferentes subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Estes receptores são expressos em neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos T e B, macrófagos, células dendríticas, células do epitélio brônquico, fibroblastos e células endoteliais (ANTONIOLI et al., 2014; CORTÉS et al., 2015).

A ativação dos receptores de adenosina pode promover diferentes efeitos biológicos, que muitas vezes são antagonísticos. A interação da adenosina com os receptores A₁, A_{2A} e A₃ inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- α , IL-6, IL-12 e proteína inflamatória de macrófago (MIP-1), ao mesmo tempo que induz a produção de IL-10, promovendo um efeito anti-inflamatório. Por outro lado, a interação da adenosina com o receptor A_{2B} pode promover efeito pró ou anti-inflamatório dependendo do tecido e das condições do microambiente (ANTONIOLI et al., 2014). Por exemplo, em modelos experimentais de colite e isquemia pulmonar, observou-se que a interação da adenosina com o receptor A_{2B} induz a expressão e a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios (IL-6, TNF- α , IFN- γ) (ANVARI et al., 2010; INGERSOLL et al., 2012).

Além de enzimas e células, outros mediadores também são liberados na resposta inflamatória. Dentre eles pode-se destacar o óxido nítrico (NO).

O NO é um radical livre gasoso que regula as funções celulares em condições fisiológicas, incluindo o relaxamento vascular, a inibição da agregação plaquetária, a

neurotransmissão, as atividades antimicrobiana e anti-tumoral dos macrófagos, entre outras (PREDONZANI et al., 2015; WALTZ et al., 2015).

O NO é sintetizado a partir do metabolismo do aminoácido L-arginina mediado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esta enzima apresenta três isoformas: NOS neuronal (NOS_n ou NOS1), NOS endotelial (NOS_e ou NOS3) e NOS induzida (NOS_i ou NOS2) (KOBAYASHI, 2010; ASTUTI; NASUNO; TAKAGI, 2016).

As isoformas NOS1 e NOS3 produzem pequenas quantidades de NO, envolvidas na manutenção das funções fisiológicas do organismo, por isso são ditas isoformas constitutivas (ASTUTI; NASUNO; TAKAGI, 2016).

Por outro lado, a atividade da isoforma NOS2, expressa por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células endoteliais e epiteliais, resulta na produção de grande quantidade de NO, que está associada a condições patológicas, tais como lúpus eritematoso sistêmico (SANDOUGHGI et al., 2016), asma (DABBOUS et al., 2016) e doença inflamatória intestinal (IKONOMI et al., 2016).

Além do NO, outros mediadores são liberados durante o processo inflamatório, entre eles as citocinas. As citocinas interagem com receptores específicos nas células alvo promovendo seu efeito biológico. Estes receptores estão localizados na membrana celular ou no citoplasma, e normalmente estão presentes em pequeno número (BRYANT; SLADE, 2015).

Dentre as principais citocinas que participam ativamente do processo inflamatório destacam-se o TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17A, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e IL-10 (KAPOOR et al., 2011; BRYANT; SLADE, 2015).

O TNF- α é uma citocina associada a doenças inflamatórias importantes, como a artrite reumatóide (WEI et al., 2016a), a asma (HUANG et al., 2016) e a colite ulcerativa (SONG et al., 2016).

A secreção de TNF- α sinaliza o dano tecidual, o que resulta em diferentes tipos de respostas celulares, tais como: efeitos citotóxicos em células tumorais, indução de moléculas de adesão que favorecem a migração leucocitária para o sítio inflamatório, atuação sobre a função de neutrófilos mediando

processos como adesão, quimiotaxia, degranulação, entre outras (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010; ZELOVÁ; HOŠEK, 2013). Tais efeitos ocorrem pela interação do TNF- α com seus receptores tipo 1 e 2 (TNFR1 e TNFR2) e, juntamente com complexos proteicos, tais como o fator 2 associado ao receptor de TNF- α (TRAF2), promovem a ativação do NF- κ B e da proteína ativadora 1 (AP-1) (SEDDER; MCDERMOTT, 2014).

O IFN- γ é uma citocina que ativa macrófagos e neutrófilos em resposta a diferentes estímulos, como LPS ou DNA bacteriano, por meio da interação com seu receptor nas células alvo. Esta citocina também estimula a expressão do MHC-II nas células apresentadoras de antígenos (APC) (SCHURGERS; BILLIAU; MATTHYS, 2011). Paralelamente, o IFN- γ ainda é capaz de induzir a expressão do MHC-II em células que normalmente não expressariam esta molécula, o que associa esta citocina ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico (WANG et al., 2015).

Durante o processo inflamatório, o IFN- γ atua sinergicamente com o TNF- α estimulando a secreção de quimiocinas e a diferenciação de células T virgens em células Th1 (JIN et al., 2016; LIM et al., 2016). Paralelamente, o IFN- γ ainda induz a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais, promovendo o recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação (BISWAS et al., 2015).

A IL-6 é uma citocina que apresenta diferentes funções biológicas, dentre as quais se destacam: a proliferação e a diferenciação celular, especialmente de células Th17, de monócitos/macrófagos e células dendríticas (DITTRICH; HESSENKEMPER; SCHAPER, 2015; FONTES; ROSE; ČIHÁKOVÁ, 2015; SCHAPER; ROSE-JOHN, 2015). Além de estimular a secreção de IL-21 por células Th virgens e por células T de memória e estimular a produção de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) por células B e de proteínas de fase aguda, tais como proteína C reativa e haptoglobina, a IL-6 ainda é capaz de induzir a produção e α 1-antitripsina, pelos hepatócitos (RATH et al., 2015).

Em contrapartida, a IL-6 é capaz de induzir a diferenciação de linfócitos B regulatórios (Breg), que por sua vez secretam IL-10, citocina de propriedades anti-inflamatórias, auxiliando na resolução do processo inflamatório (ROSSER et al., 2014).

A IL-6 é considerada o mediador chave na transição da inflamação de fase aguda para crônica, uma vez que inibe o influxo de neutrófilos e estimula o influxo e a ativação de leucócitos mononucleares no local da inflamação (FONTES; ROSE; ČIHÁKOVÁ, 2015; RATH et al., 2015).

Reconhecida não somente como um marcador pró-inflamatório, a IL-6 ainda está relacionada à patogênese de doenças como a doença pulmonar obstrutiva crônica (WEI et al., 2015) e a artrite reumatoide (SU et al., 2016).

Dentre várias quimiocinas liberadas durante o processo inflamatório, destaca-se a MCP-1, também denominada de quimiocina C-C ligante 2 (CCL2), uma vez que é um potente fator quimiotático de monócitos (DESHMANE et al., 2009). A MCP-1 pode ser produzida constitutivamente ou após estímulos diversos, incluindo estresse oxidativo, citocinas e fatores de crescimento. Trata-se de um mediador importante nas respostas imunes e durante o processo inflamatório, regulando a migração e a infiltração de células NK, monócitos e linfócitos T para os tecidos (DESHMANE et al., 2009; KOLATTUKUDY; NIU, 2012). Ainda, sabe-se que esta quimiocina está relacionada com a patogênese de doenças como a asma (SZALAI et al., 2001; LEE et al., 2015), a osteoartrite (XU et al., 2015) e as doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (BOSE; CHO, 2013; ZHANG et al., 2013).

A IL-17 é um importante mediador do processo inflamatório capaz de induzir a liberação de quimiocinas, citocinas, metaloproteinases de matriz (MMP) e peptídeos anti-microbianos de células mesenquimais e mielóides (ISAILOVIC et al., 2015). Como resultado dos eventos mediados pela IL-17, há a ativação e o acúmulo de leucócitos no local da inflamação, além da ativação do sistema imune inato e adaptativo.

Paralelamente, dados da literatura evidenciam a participação desta citocina na patogênese da asma (HALWANI et al., 2014) e da artrite reumatoide (GULLICK et al., 2013). Na artrite reumatoide, a IL-17 (principalmente a IL-17A) se encontra em concentrações elevadas no líquido sinovial e contribui para o desenvolvimento do processo inflamatório nas articulações, além estar envolvida na destruição da cartilagem e na erosão óssea. Isso ocorre uma vez que, dentre outras atividades, a IL-17 é capaz de induzir a secreção de IL-6, TNF- α e IL-1 β por

fibroblastos, células endoteliais e macrófagos nas articulações inflamadas (JOVANOVIĆ et al., 1998; CHABAUD et al., 1999).

Outra citocina importante no processo inflamatório é a IL-10. A IL-10 se destaca principalmente por sua atividade anti-inflamatória (MANNINO et al., 2015; TRIFUNOVIĆ et al., 2015). Ao interagir com seus dois receptores, IL-10R1 e IL-10R2 e, juntamente com complexos proteicos, janus quinase (JAK) e sinal transdutor e ativador de transcrição (STAT), a IL-10 ativa a via de sinalização JAK-STAT, promovendo seus efeitos biológicos (VILLARINO et al., 2015). Trata-se de um importante mediador inflamatório capaz de inibir a resposta Th1, via inibição da expressão das citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IL-5, IL-12, TNF- α e IFN- γ induzida por IFN- γ e por inibir a expressão do MHC-II nas células apresentadoras de antígeno (LEVAST; LI; MADRENAS, 2015; MANNINO et al., 2015; NI et al., 2015).

Ainda, a IL-10 é capaz de inibir a resposta Th2 e Th17, bem como a produção de quimiocinas (IL-8, CXCL10, CCL3 e CCL4), o que previne o recrutamento de células inflamatórias para o local da inflamação. Desta forma, a IL-10, inibe a resposta pró-inflamatória que ocorre na imunidade inata e adaptativa, ajudando a prevenir lesões nos tecidos (LEVAST; LI; MADRENAS, 2015; MANNINO et al., 2015; NI et al., 2015).

Pacientes com doenças como artrite reumatoide (YUDOH et al., 2000; GUGGINO et al., 2015) e psoríase (HAYASHI et al., 2016), apresentam concentrações reduzidas de IL-10, fato que é fortemente associado à severidade da doença. Por outro lado, pacientes com lúpus eritematoso sistêmico apresentam concentrações elevadas de IL-10, que induz a produção de auto-anticorpos por células B, indicando que esta citocina também é importante na patogênese de doenças autoimunes (HEDRICH et al., 2014; GODSELL et al., 2016).

Além das células e dos mediadores, alguns fatores de transcrição e proteínas cinase ativadas por mitógeno (MAPK) estão envolvidos diretamente no processo inflamatório, mediando as respostas biológicas, como a produção de citocinas, apoptose, a sobrevivência, a diferenciação, a proliferação e/ou a migração celular.

Dentre os fatores de transcrição, podemos destacar NF- κ B. O NF- κ B é um fator de transcrição essencial em diversos processos biológicos, incluindo inflamação, imunidade e

apoptose, regulando a atividade de diversos genes, dentre os quais se pode destacar os genes relacionados à produção de enzimas, como NOS2 e COX-2, de interleucinas (IL-1, IL-6, IL-17), TNF- α e de moléculas de adesão (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1) (BATRA; BALAMAYOORAN; SAHOO, 2011).

Quando não estimulado, o NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Para a ativação do NF- κ B e posterior translocação para o núcleo, é necessário que ocorra a fosforilação e a degradação do I κ B. O I κ B, assim como as subunidades que compõe o NF- κ B, pertence à família de proteínas Rel. Os subtipos mais estudados de proteínas inibitórias são o I κ B α e o I κ B β (BATRA; BALAMAYOORAN; SAHOO, 2011; OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011).

A ativação do NF- κ B pode ocorrer via diversos fatores, tais como: neurotransmissores (glutamato), citocinas (IL-1 e TNF- α), ésteres de forbol, ceramidas, produtos provenientes de vírus e bactérias, radiação ultravioleta e produtos de reações de enzimas como a NOS2 e a COX-2 (BATRA; BALAMAYOORAN; SAHOO, 2011; HAYDEN; GHOSH, 2014).

A literatura descreve três vias de ativação do NF- κ B: a clássica (canônica), a alternativa (não-canônica) e a atípica (KRIETE; MAYO, 2009; HAYDEN; GHOSH, 2011).

A via clássica corresponde a via de ativação do heterodímero p50/RelA por meio da interação de LPS, TNF- α ou IL-1 com seus receptores, o receptor do tipo *Toll* (TLR), receptor de fator de necrose tumoral (TNFR) e receptor de interleucina 1 (IL-1R), respectivamente. A via alternativa é via de ativação do heterodímero p52/RelB pelo conjunto de receptores da família do TNF, que inclui receptores de linfotoxina β (LT β R), receptor de fator ativador de células B (BAFF), receptor ativador de NF- κ B (RANK) e o ligante de CD40 (CD40L). Por fim, a via atípica é a via de ativação do NF- κ B mediada por estresse oxidativo ou genotóxico (GLOIRE; LEGRAND-POELS; PIETTE, 2006; KRIETE; MAYO, 2009).

Com a ativação da via clássica do NF- κ B, os receptores TLR4 e TNFR recrutam proteínas adaptadoras como o fator de diferenciação mieloide 88 (Myd88), o adaptador contendo domínio *Toll*/IL-1R induzido por interferon- β (TRIF), a molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM) e o fator regulatório de

interferon 3 (IRF-3), para o domínio intracelular que resultará na ativação de mediadores subsequentes na cascata de sinalização.

O fator 6 associado ao receptor de fator de necrose tumoral (TRAF6) é uma proteína presente na via clássica que exerce atividade de ubiquitina ligase e está envolvida na fosforilação e ativação de IKK, que, uma vez ativada, promoverá a fosforilação da proteína inibitória I κ B, que por sua vez, ativará NF- κ B (RIM et al., 2012; WANG et al., 2013). Enquanto que a proteína 3 induzida por TNF- α (TNFAIP3) é uma proteína que regula negativamente a via do NF- κ B através da remoção das porções de ubiquitina de TRAF6 ou pela ligação direta ao TRAF6, impedindo sua atividade (YU et al., 2014a).

A ativação persistente de NF- κ B e a consequente produção contínua de mediadores inflamatórios (TNF- α e IL-6 e IL-17) tem forte relação com a patogênese de doenças como a asma (HART et al., 1998; SHIMIZU et al., 2012) e a artrite reumatoide (FUJISAWA et al., 1996; ŚWIĘRKOT et al., 2016).

A ativação de alguns fatores de transcrição envolvidos no processo inflamatório depende não apenas de mediadores como citocinas e fatores de crescimento, mas também da ativação da cascata das MAPK (SZYMANSKA; SKOWRONEK; MIACZYNSKA, 2016).

As MAPK englobam várias cinases que fosforilam serina e treonina e regulam os processos celulares, como: crescimento, proliferação e diferenciação celular. Estas cinases dividem-se em três subfamílias: cinases reguladas por sinal extracelular (ERK); cinases c-Jun N-terminal (JNK) e as cinases p38 (PASTUHOV; HISAMOTO; MATSUMOTO, 2015).

A p38 MAPK tem um papel central em respostas inflamatórias regulando múltiplas cascatas de sinalização e está amplamente expressa em diferentes células, incluindo células do sistema imunológico (macrófagos, monócitos e neutrófilos). Diferentes estímulos são capazes de ativar a p38 MAPK, dentre eles o estresse, LPS, peptídeoglicanos, radiação ultravioleta e citocinas (TNF- α , IL-1 β). Além disso, essa proteína está envolvida em processos de autofagia, apoptose e diferenciação celular (YANG et al., 2014). Essa cinase é capaz de regular a expressão gênica por meio de quatro diferentes mecanismos: I) fosforilação direta de fatores de transcrição; II) regulação da estabilidade no RNA mensageiro (RNAm); III) regulação de

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

Tipicamente, a ativação das MAPK é iniciada por citocinas inflamatórias, como o TNF- α , que ao interagirem com seus receptores, promovem a ativação da cascata. A p38 MAPK pode ser ativada intracelularmente, por duas diferentes MAP cinase cinase (MAPKK). As duas MAPKKs geralmente responsáveis pela ativação da p38 MAPK são MAPKK3 e a MAPKK6, embora outras cinases possam ativar a p38 MAPK. Após sua fosforilação, a p38 MAPK é capaz de induzir fatores de transcrição e proteínas intracelulares como o fator ativador de transcrição (ATF-1/2/6), proteína ligante ao elemento de resposta de adenosina monofosfato cíclica AMPc, fator de resposta sérica (SRF), fator otimizador de miócitos 2, fator de transcrição induzido por dano ao DNA 3, proteína específica de linfócitos 1, tristetraprolina e cinase interativa com MAPKs, os quais ativam a transcrição de genes que expressam moléculas de adesão (VCAM-1) e mediadores inflamatórios, tais como citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-8), COX-2 e prostaglandinas E₂ (PGE₂) (ZARUBIN; HAN, 2005; YANG et al., 2014; PASTUHOV; HISAMOTO; MATSUMOTO, 2015; YOKOTA; WANG, 2016).

Devido à contribuição da p38 MAPK para o desenvolvimento do processo inflamatório, moléculas inibidoras dessa MAPK vêm sendo alvo de pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos com ação anti-inflamatória (LUKEY, 2012; KREMENTSOV et al., 2013; MACNEE et al., 2013; RASK-ANDERSEN et al., 2014).

Outra via das MAPKs não menos importante é a ERK. A via da ERK é encontrada em todas as células eucaritóticas e está associada principalmente com a proliferação, a diferenciação, a migração, a senescência e a apoptose celular (SUN et al., 2015). Tem como principal MAPKKK a isoforma Raf-1 (ou c-Raf), enquanto que a MAPKK desta via é constituída das isoformas MEK1/2 (proteína cinase cinase ativada por mitógeno 1/2). Raf-1 faz parte da família das isoformas Raf que são proteínas capazes de fosforilar as MEKs em uma cascata única. Esta via constitui uma cascata de eventos de ativação enzimática por meio de

fosforilações que resultam em ativação da ERK 1/2 e seus substratos (SUN et al., 2015).

A via de sinalização da ERK pode ser ativada em resposta a estímulos, como fatores de crescimento, estresse e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β) (REBER et al., 2009; SUN et al., 2015). Entretanto, a ERK também participa da resposta inflamatória, promovendo, indiretamente, a transcrição de genes de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) e quimiocinas (MCP-1) (CARTER; MONICK; HUNNINGHAKE, 1999; KUROSAWA et al., 2000; SUN et al., 2008; LEYVA-ILLADES et al., 2012). Isso ocorre uma vez que, durante o processo inflamatório, como consequência da ativação da via de sinalização da ERK, há a ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B e AP-1 (FROST et al., 1994; REBER et al., 2009).

1.4 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS ESTEROIDAIIS OU GLICOCORTICOIDES

Desde a sua descoberta na década de 1940, e o reconhecimento de seus efeitos anti-inflamatórios, os glicocorticoides, naturais e sintéticos, são amplamente utilizados no tratamento de doenças autoimunes e doenças inflamatórias agudas e crônicas (BARNES, 2010; MONTUSCHI, 2010; VANDEVYVER et al., 2013; FU et al., 2016; HEIER et al., 2016).

Entretanto, sua eficácia clínica é comprometida pelos efeitos metabólicos do seu uso em longo prazo, que incluem osteoporose, hipertensão, dislipidemia e diabetes mellitus tipo 2 (SCHÄCKE; DÖCKE; ASADULLAH, 2002; MOGHADAM-KIA; WERTH, 2010).

O mecanismo de ação dos glicocorticoides é complexo e pode ser classificado em genômico e não-genômico (COUTINHO; CHAPMAN, 2011; AYROLDI et al., 2012; VANDEVYVER et al., 2013).

O efeito genômico ocorre por meio da interação do glicocorticoide com um receptor específico presente na membrana citoplasmática, seguido da translocação do complexo glicocorticoide-receptor para o núcleo, onde o mesmo atua como um fator de transcrição, ligando-se a elementos responsivos aos glicocorticoides na região promotora de diversos genes alvos e,

desta forma, modula a expressão gênica de diversos mediadores por transrepressão ou transativação (KING et al., 2013).

Por meio da transrepressão gênica, o complexo glicocorticoide-receptor atua sobre fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1, impedindo a transcrição de genes alvo, tais como de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, IL-13, IL-15, TNF- α), de enzimas pró-inflamatórias (NOS2, COX-2 e fosfolipase A2), de fatores de crescimento e de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1), além de inibir a expressão gênica do óxido nítrico, via inibição de NOS2, de prostanoídes, autacóides (histamina), entre outros (AYROLDI et al., 2012; KING et al., 2013; VANDEVYVER et al., 2013).

Paralelamente, os glicocorticóides, através da transativação gênica, promovem a transcrição de genes de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-22, antagonista do receptor de IL-1 - IL-1Ra), do I κ B α , inibindo a ativação da via do NF- κ B, além de aumentar a expressão gênica da fosfatase 1 da proteína cinase ativada por mitógeno (MKP-1) e da anexina 1, que por sua vez inibem a via das MAPK (AYROLDI et al., 2012).

Além disso, os glicocorticóides promovem também os efeitos não-genômicos, dentre os quais: I) sinalização por meio de um receptor de membrana citoplasmática; II) interação do receptor de glicocorticoide com outras proteínas sinalizadoras no citoplasma celular, tais como as proteínas cinases (Lck, Fyn e Zap-70); ou III) translocação do receptor de glicocorticoide para a mitocôndria (NEWTON, 2000; AYROLDI et al., 2012; KING et al., 2013).

No presente estudo, utilizou-se a dexametasona como fármaco anti-inflamatório de referência por duas razões:

- a) De acordo com a literatura, o modelo experimental utilizado neste estudo (pleurisia) é um modelo importante para o estudo do efeito de corticóides sobre a inibição da migração leucocitária e da formação de exsudato (SEDGWICK; LEES, 1986);
- b) O uso da dexametasona como fármaco de referência permite a comparação com outras substâncias, fármacos ou plantas, que tenham a mesma via de sinalização na inibição da resposta inflamatória.

Entretanto, destaca-se que o uso da dexametasona como fármaco anti-inflamatório apresenta algumas desvantagens, dentre elas a toxicidade e os efeitos adversos desencadeados pelo uso prolongado de glicocorticoides, como síndrome de Cushing, diabetes mellitus tipo 2, dislipedemia e osteoporose.

1.5 MODELOS DE INFLAMAÇÃO

Há mais de 80 anos, o meio científico faz uso de modelos animais no estudo do processo inflamatório e autoimune. Sabe-se que, mesmo que o animal não desenvolva a doença humana de forma natural, os modelos experimentais auxiliam a compreender, em parte, os aspectos de diversas patologias. Ou seja, os modelos animais podem reproduzir/mimetizar certos aspectos da doença humana, porém não a doença em si (WEBB, 2014).

Mesmo que a maioria das doenças inflamatórias, severas e debilitantes, em seres humanos seja de caráter crônico, a maioria dos modelos experimentais utilizados na pesquisa são modelos de inflamação aguda. Mesmo assim, estes modelos são úteis principalmente por duas razões. Primeiro, porque modelos de inflamação aguda simples e reproduzíveis são ideais para pesquisa e triagem de novos fármacos e/ou substâncias com potencial propriedade anti-inflamatória. Segundo, porque os modelos de inflamação aguda auxiliam no estudo dos mecanismos envolvidos na transição da fase aguda para fase crônica na inflamação. Além do mais, modelos de inflamação aguda permitem avaliar o tempo de resposta de componentes celulares e vasculares envolvidos na inflamação (SEDGWICK; LEES, 1986; WEBB, 2014).

Modelos experimentais de inflamação de cavidade são de especial interesse no estudo da artrite, uma vez que a inflamação neste caso é localizada na cavidade sinovial. A cavidade pleural, por sua vez, é uma região anatômica adequada para avaliação de migração leucocitária, concentração de mediadores da inflamação e edema, características comuns de doenças inflamatórias do trato respiratório (WILLOUGHBY, 1975; SEDGWICK; LEES, 1986).

A injeção de agentes irritantes, tais como histamina, bradicinina, prostaglandinas ou carragenina, na cavidade pleural,

induz o desenvolvimento do modelo experimental denominado pleurisia. A pleurisia é considerada por alguns autores como um dos melhores modelos de inflamação aguda (CAPASSO et al., 1975; WILLOUGHBY, 1975; DHALENDRA; SATAPATHY; ROY, 2013). Destaca-se que a pleurisia foi um dos modelos experimentais utilizados no estudo pré-clínico do medicamento anti-inflamatório Acheflan® (*Cordia verbenacea*) (PASSOS et al., 2007).

De acordo com estudo publicado por Saleh, Calixto e Medeiros (1996), no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, observa-se uma resposta inflamatória do tipo bifásica (Figura 2). A primeira fase desta resposta (4 h) é caracterizada pela formação de exsudato e o aumento da infiltração de leucócitos, principalmente de neutrófilos, na cavidade pleural dos camundongos. Por outro lado, na segunda fase (48 h), também se observa o aumento da exsudação, porém a infiltração de leucócitos é mediada predominantemente por mononucleares (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

Dentre os possíveis agentes flogísticos para indução da pleurisia, pode-se destacar a carragenina. A carragenina é uma mistura de polissacarídeos extraída das algas *Euclima denticulatum*, *Kappaphycus alvarezii*, *Chondrus crispus* e *Gigartina radula* (PRAJAPATI et al., 2014).

De acordo com a literatura, a classificação antiga da carragenina dividia a substância em duas famílias kappa (κ) e lambda (λ) de acordo com a solubilidade em cloreto de potássio (KCl), sendo κ a carragenina solúvel e λ a insolúvel em KCl. Mais tarde, a classificação baseada no número, na posição dos grupamentos sulfatos e na presença de pontes 3',6'-anidro nos resíduos D-galactopiranosilos deu origem a 8 famílias: kappa (κ), beta (β), lambda (λ), iota (ι), nu (ν), mu (μ), theta (θ) e xi (ξ), sendo κ , λ , ι as carrageninas de relevante interesse comercial.

Das carrageninas de interesse comercial, a variação λ é a que apresenta maior conteúdo de éster sulfato em sua estrutura química, conferindo a ela boa solubilidade em água, propiciando alta viscosidade, porém sem o inconveniente da gelificação (PRAJAPATI et al., 2014; LIU et al., 2015).

Apesar de ser uma substância irritante e de desencadear uma resposta inflamatória significativa, o principal inconveniente

do uso da carragenina como agente flogístico é o fato de seu mecanismo de ação não ser completamente elucidado. Em 2003, um estudo realizado por Tsuji e colaboradores relatou que a ativação da resposta imune inata pela carragenina era dependente de TLR4 e Myd88, e resultava na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6. Em 2008, um estudo conduzido por Bhattacharyya e colaboradores descreveu que o efeito inflamatório da carragenina estava relacionado à ativação de NF- κ B, via TLR4 e Bcl10, resultando no aumento da produção de IL-8. Porém, o mecanismo de ação descrito não esclarecia todos os efeitos observados na inflamação induzida pela carragenina. Ainda em 2008, o mesmo grupo de pesquisa publicou um novo estudo que associou o efeito da carragenina sobre NF- κ B não apenas à Bcl10, mas também à produção de espécies reativas de oxigênio (BHATTACHARYYA; DUDEJA; TOBACMAN, 2008).

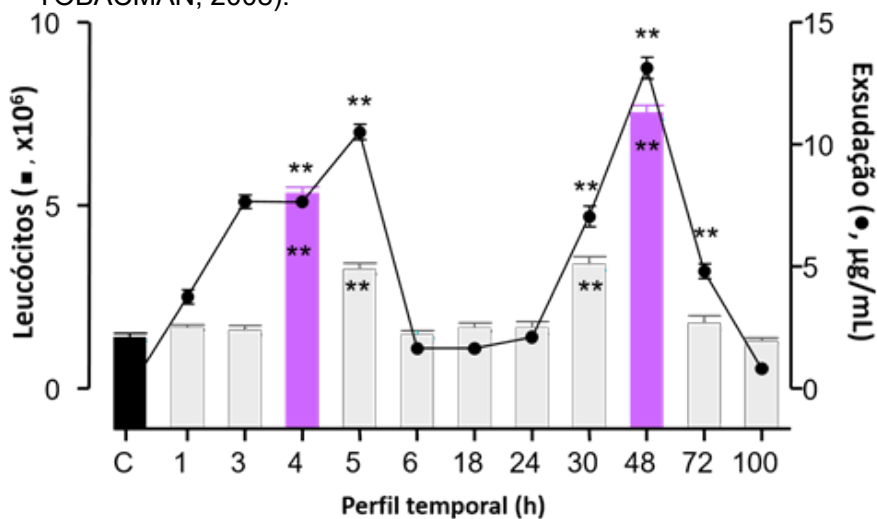


Figura 2 - Perfil temporal do modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. O modelo de inflamação induzido pela carragenina é caracterizado por uma resposta inflamatória do tipo bifásica. Na primeira fase (4 h) ocorre o aumento da infiltração de leucócitos, principalmente neutrófilos, bem como a exsudação na cavidade pleural. Já na segunda fase (48 h), observa-se, também, o aumento da exsudação, além do aumento de células mononucleares. Adaptado de (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

Neste trabalho, para o estudo do efeito anti-inflamatório da *A. conyzoides* L., optou-se pelo modelo experimental da pleurisia induzida carragenina λ em camundongos, utilizando-se apenas a primeira fase da resposta inflamatória, que ocorre 4 h após a indução da inflamação na cavidade pleural pelo agente flogístico.

A escolha da pleurisia como modelo experimental levou em consideração as vantagens e as desvantagens do modelo, dentre elas (SEDGWICK; LEES, 1986; DHALENDRA; SATAPATHY; ROY, 2013):

- a) É um modelo de inflamação adequado para triagem de novos fármacos e substâncias com potencial efeito anti-inflamatório;
- b) Permite a análise de diferentes parâmetros em um único analito, o lavado pleural;
- c) O lavado pleural é livre da contaminação por sangue, evitando interferências de células e mediadores que não estejam envolvidos na inflamação;
- d) É um modelo experimental de simples e rápida execução;
- e) Como a cavidade pleural é uma região altamente vascularizada, o volume de substância irritante, no caso, a carragenina, é menor que em outros modelos experimentais de cavidade, como o modelo da bolsa de ar;
- f) E, ainda devido à vascularização da cavidade pleural, o tempo de resposta do modelo é inferior ao de outros modelos de inflamação (bolsa de ar);
- g) A pleurisia apresenta aspectos inflamatórios comuns em diversas doenças inflamatórias e não mimetiza uma única doença humana;
- h) Assim, este modelo não possibilita o estudo de características particulares de uma doença humana específica.

No que diz respeito à carragenina, a variação λ foi escolhida como agente flogístico devido ao seu intenso efeito irritante e boa solubilidade em solução salina (NaCl 0,9%) (PRAJAPATI et al., 2014; LIU et al., 2015).

A escolha da planta alvo deste estudo, a *A. conyzoides* L., foi baseada em dois aspectos. Primeiro, porque se trata de uma planta cujo uso popular como anti-inflamatório já é bem estabelecido (OKUNADE, 2002; SINGH et al., 2013). Segundo, porque ainda há poucos registros científicos que elucidem seu mecanismo de ação anti-inflamatório.

A via de administração escolhida para o extrato bruto, frações e compostos isolados da *A. conyzoides* L. foi a via intraperitoneal (i.p.). Trata-se de uma via de administração sistêmica que apresenta diversas vantagens, dentre elas (TURNER et al., 2011):

- a) É uma via indicada para animais de pequeno porte, como camundongos;
- b) Permite a administração de volumes maiores do que o permitido por outras vias de administração, em animais de pequeno porte;
- c) Apesar de ser uma via parenteral, a farmacocinética das substâncias administradas via intraperitoneal se assemelha a via oral, uma vez que a absorção ocorre principalmente nos vasos mesentéricos, que drenam para veia porta, passando pelo fígado. Assim, as substâncias administradas via i.p. sofrem metabolismo de primeira passagem antes de atingirem a circulação sistêmica.
- d) É uma técnica simples e menos estressante para o animal que a via de administração oral;
- e) Evita os contratempos da via de administração oral, tais como o risco de provocar vômito e/ou diarreia nos animais, interferência pela dieta, falta de absorção sistêmica pelo intestino, degradação por enzimas e ácidos digestivos.

1.6 HIPÓTESE

O extrato bruto, frações etanol, hexano, acetato de etila e diclorometano, e os compostos isolados, 5'-metoxi nobiletina, 1,2-benzopirona e eupalestina possuem efeito anti-inflamatório.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados da *A. conyzoides* L., administrados via i.p., no modelo da pleurisia induzida pela carragenina λ , em camundongos e elaborar uma revisão bibliográfica do efeito anti-inflamatório das cumarinas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto (EB), frações etanol (EtOH-F), hexano (HEX-F), acetato de etila (AcOEt-F) e diclorometano (DCM-F), bem como dos compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB), 1,2-benzopirona (BP) e eupalestina (EP) obtidos das partes aéreas da *A. conyzoides* L., sobre a migração dos leucócitos e concentração das proteínas do exsudato, na inflamação induzida por carragenina λ ;
- II. Investigar o efeito do EB, frações e compostos isolados sobre as concentrações das enzimas MPO e ADA;
- III. Investigar o efeito do EB, frações e compostos isolados sobre as concentrações de NOx, IL-17A, IL-6, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 e IL-10;
- IV. Investigar o efeito dos compostos isolados MeONOB, BP e EP sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B, da p38 MAPK e da ERK.
- V. Realizar uma revisão sistemática sobre o efeito anti-inflamatório das cumarinas, a partir de dados extraídos de artigos publicados em revistas científica indexadas nas bases de dados PUBMED, MEDLINE, Web of Science e Scopus, no período entre 1º de janeiro de 2005 e 31 de dezembro de 2015.

3. METODOLOGIA

ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO

3.1 MATERIAL VEGETAL

3.1.1 Coleta do material vegetal

As partes aéreas (folhas, flores e galhos) da *A. conyzoides* L. foram coletadas em novembro de 2010 (48° 31,018' W e 27° 35,855' S) e agosto de 2011 (48° 25,157' W e 27° 23,492' S), no município de Florianópolis, Santa Catarina. A espécie foi identificada pelo botânico Prof. Dr. Renato Záchia e a excicata (No. SMDB 13.138) encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal de Santa Maria.

3.1.2 Obtenção do extrato do bruto, frações e compostos isolados da *A. conyzoides* L.

A preparação do extrato bruto, frações e compostos isolados foi realizada pelas alunas Cristiane Fracari Bosi e Daniela W. Rosa, sob orientação da Prof^a Dra. Maique Weber Biavatti, no laboratório de farmacognosia da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Para realização do protocolo de extração, as partes aéreas (folhas, flores e galhos) da *A. conyzoides* L. (2 kg) foram inicialmente secas em estufa com circulação de ar e temperatura controlada de 50°C por 6 dias. A seguir, o material vegetal foi triturado em liquidificador e armazenado a 8°C, em geladeira, até o momento do uso.

O EB foi obtido a partir da maceração de 1 kg de material vegetal seco e triturado com etanol 95% (3 L), concentrado em rotaevaporador (Heidolph, Schwabach, Germany), formando 60 g de EB (Figura 3).

Para a obtenção das EtOH-F e HEX-F, 1 kg de material vegetal seco e triturado foi submetido à extração seletiva com diferentes solventes de polaridades crescentes: *n*-hexano e etanol. Com a remoção do etanol em rotaevaporador, foi obtida a EtOH-F (30 g). Essa fração foi então dissolvida em 600 mL de

água e particionada com solventes de polaridades crescentes, originando as sub-frações DCM-F (8 g) e AcOEt-F (2,5 g), e uma fração aquosa remanescente (Figura 3).

Para a obtenção dos compostos isolados, a DCM-F foi cromatografada em coluna sílica gel tipo “flash”, utilizando-se como eluentes gradientes de diclorometano e metanol. Desta cromatografia, foram coletadas 100 porções. As porções 27-34 resultaram em 700 mg da cumarina BP, e as porções 35-69 em uma mistura de flavonoides metoxilados, que foram re-cromatografados em coluna sílica gel do tipo “flash”, utilizando-se como eluentes gradientes de diclorometano e metanol, e assim obtendo-se os compostos purificados EP (60 mg) e MeONOB (90 mg) (Figura 3).

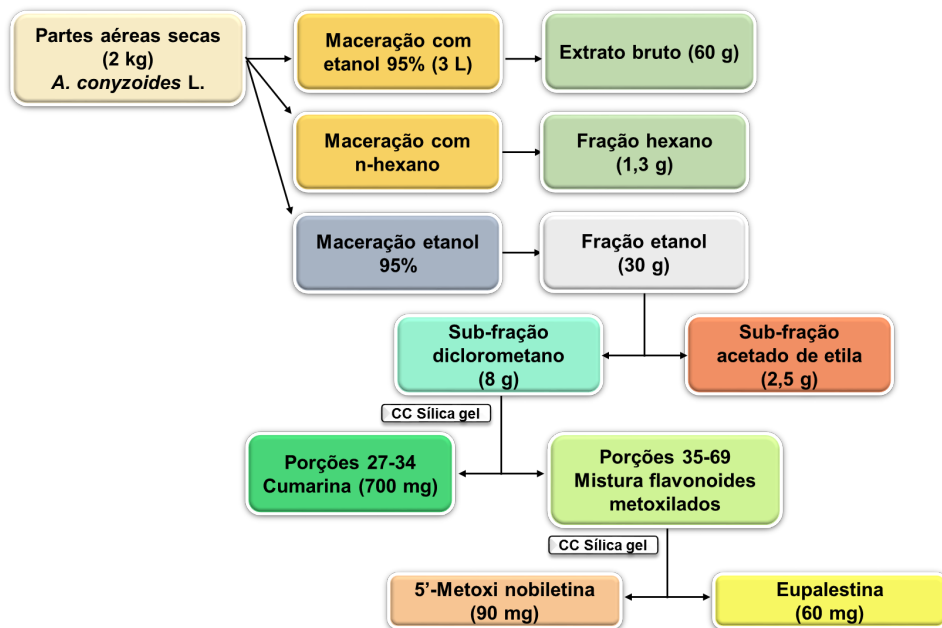


Figura 3 - Esquema de extração do extrato bruto, das frações e dos compostos isolados a partir das partes aéreas da *A. conyzoides* L.

Os compostos isolados obtidos MeONOB, BP e EP (Figura 4) foram identificados por comparação dos dados de ¹H NMR com os dados da literatura (VYAS; MULCHANDANI, 1984; KUPRIYANOVA, 1997; WANG et al., 2005). A análise NMR foi

realizada em Ascend 600 (600 MHz for ^1H , 125 MHz for ^{13}C) (Bruker Co., Germany) e os dados obtidos foram processados utilizando-se o software TopSpin 3.1.

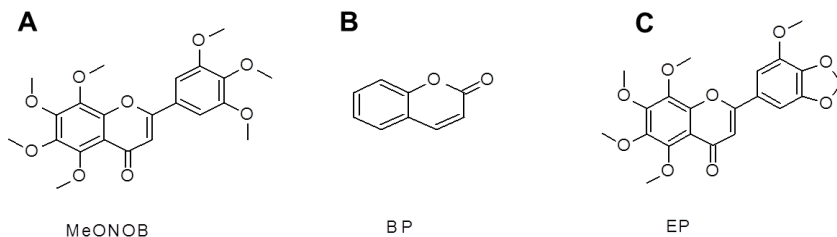


Figura 4 - A) Composto isolado 5'-metoxi nobiletina (MeONOB); B) composto isolado 1,2-benzopirona (BP); C) composto isolado eupalestina (EP) identificados por ressonância nuclear magnética.

3.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

3.2.1 Animais

Nestes experimentos, foram utilizados camundongos albinos *Swiss*, 1 mês de idade, ambos os sexos, pesando entre 18 e 22 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas com serragem, sob temperatura ambiente e luz artificial, com ciclo de claro e escuro de 12 h, com alimentação e água *ad libitum* e ambientados no biotério setorial por no mínimo 7 dias. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – protocolo número PP00757) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.2.2 Procedimento anestésico

A anestesia foi induzida com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), administrada por via intraperitoneal (i.p), a fim de possibilitar a administração do corante azul de Evans (25 mg/kg), administrado por via intravenosa (i.v.), para posterior avaliação das proteínas do exsudato.

3.2.3 Eutanásia dos animais

Os animais, previamente anestesiados, foram submetidos à eutanásia com cloreto de potássio (KCl) (125 mg/kg, i.v.). Antes da administração do KCl, os reflexos dos animais foram testados, a fim de confirmar a completa anestesia.

3.2.4 Pleurisia induzida pela carragenina em camundongos

A técnica da pleurisia foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Saleh, Calixto e Medeiros (1996). No dia do experimento, os animais receberam 0,1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,95%) ou do agente flogístico carragenina (1%), administrados na cavidade pleural direita através do espaço intercostal utilizando-se uma agulha 13 x 5 mm, adaptada a uma cânula de poliestireno. De acordo com o protocolo experimental, os animais foram submetidos à eutanásia 4 h após a administração da carragenina. A seguir, os mesmos foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30° a 45°, e realizou-se uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Logo, o apêndice xifoide foi pinçado e a cavidade pleural foi exposta através de duas incisões paralelas ao longo do esterno. Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada com duas alíquotas de 0,5 mL (totalizando 1 mL) de solução salina tamponada [pH 7,6, NaCl (130 mM), Na₂HPO₄ (5 mM), KH₂PO₄ (1 mM) e heparina (20 UI/mL)]. Alíquotas do lavado da cavidade pleural foram coletadas com auxílio de pipeta automática para a quantificação total e diferencial de leucócitos. Conforme o protocolo experimental, 10 minutos antes da administração do extrato bruto, alguns grupos de animais receberam a injeção de solução de azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL/animal, i.v.), permitindo a determinação da concentração de proteínas do exsudato no lavado da cavidade pleural (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

Para avaliação das concentrações das enzimas MPO e ADA, concentrações de NOx, IL-17A, IL-6, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 e IL-10, e fosforilação da subunidade p65 de NF- κ B, p38 MAPK e ERK os animais não receberam a injeção com azul de Evans, uma vez que este corante pode interferir nos ensaios utilizados para a quantificação desses parâmetros.

3.2.5 Protocolo experimental

Inicialmente foi realizado o grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina 1%, i.pl.) e o grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl, 0,9%, i.pl.).

Paralelamente, a fim de avaliar se o veículo utilizado para dissolver o extrato bruto, as frações e compostos isolados promovia algum efeito tóxico e/ou alteração nos parâmetros inflamatórios, um grupo de animais recebeu a administração intraperitoneal do veículo (solução de salina tamponada + DMSO 10%).

Para avaliar se a solução do extrato bruto exibia efeito tóxico e/ou alteração nos parâmetros inflamatórios em condições basais, outro grupo de animais recebeu a administração intraperitoneal de solução do extrato bruto (10-200 mg/kg).

Dando continuidade ao protocolo experimental, para o estudo da curva dose-resposta (Figura 5), diferentes grupos de animais (n= 5 por grupo) foram tratados com diferentes doses de EB (10-200 mg/kg), EtOH-F (5-25 mg/kg), HEX-F (10-50 mg/kg), AcOEt-F (10-50 mg/kg), DCM-F (10-50 mg/kg) ou dos compostos MeONOB (2,5-10 mg/kg), BP (2,5-10 mg/kg) ou EP (2,5-10 mg/kg) administrados por via i.p. 0,5 h antes da indução da pleurisia com carragenina (1%), administrada por via i.pl..

Para administração do extrato bruto, frações e compostos isolados via i.p., os mesmos foram previamente solubilizados em solução isotônica de salina tamponada (NaCl a 0,95%) e quando necessário, foi adicionado 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Após 4 h, os animais foram submetidos à eutanásia e os parâmetros inflamatórios (leucócitos e proteínas do exsudato) foram analisados. A dexametasona (0,5 mg/kg) administrada por via i.p., 0,5 h antes da indução da pleurisia, foi utilizada como fármaco de referência de ação anti-inflamatória.

Em outro grupo de experimentos, para avaliar o perfil temporal, diferentes grupos de animais receberam uma dose única do EB (50 mg/kg), EtOH-F (10 mg/kg), HEX-F (50 mg/kg), AcOEt-F (50 mg/kg), DCM-F (50 mg/kg), MeONOB (5 mg/kg), BP (5 mg/kg) ou EP (5 mg/kg), em diferentes períodos de tempo (0,5-2 h) antes da administração da carragenina e os mesmos

parâmetros inflamatórios foram avaliados 4 h após a indução da pleurisia (Figura 6).

A dose escolhida para essa etapa do protocolo foi a menor dose capaz de inibir o influxo de leucócitos e/ou as proteínas do exsudato, determinada na etapa anterior deste protocolo.

Para a curva-tempo resposta escolheu-se o menor tempo pelo qual se observou inibição dos mesmos parâmetros analisados no estudo da curva dose-reposta. Com base nos resultados obtidos nos estudos das curvas dose-resposta e tempo-resposta, as seguintes doses foram escolhidas para os experimentos subsequentes: EB (50 mg/kg), EtOH-F (10 mg/kg), HEX-F (50 mg/kg), AcOEt-F (50 mg/kg), DCM-F (50 mg/kg), MeONOB (5 mg/kg), BP (5 mg/kg) e EP (5 mg/kg), administrados via i.p. 0,5 h antes da indução da carragenina. Estas doses foram utilizadas para analisar os efeitos do material vegetal sobre as concentrações das enzimas MPO e ADA, concentrações de NOx, IL-17A, IL-6, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 e IL-10 e IL-6 e sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B, p38 MAPK e ERK.

3.3 TÉCNICAS UTILIZADAS NOS ESTUDOS *IN VIVO*

3.3.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos

Após a eutanásia dos animais (4 h após a indução da inflamação), alíquotas de 15 μ L do lavado da cavidade pleural foram utilizadas para determinar a contagem total dos leucócitos, em contador celular automatizado veterinário com os parâmetros ajustados para camundongos (MINDRAY, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China). Os resultados foram expressos em número total de leucócitos $\times 10^6$ /mL.

Para a contagem diferencial dos leucócitos, 50 μ L das alíquotas do lavado da cavidade pleural foram centrifugados em citocentrífuga para confecção do esfregaço (Cytopro[®] cytocentrífuga Wescor, modelo: 7620 EUA), que posteriormente foram corados pelo método de MayGrünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1.000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram

expressos em número total de células $\times 10^6/\text{mL}$ (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

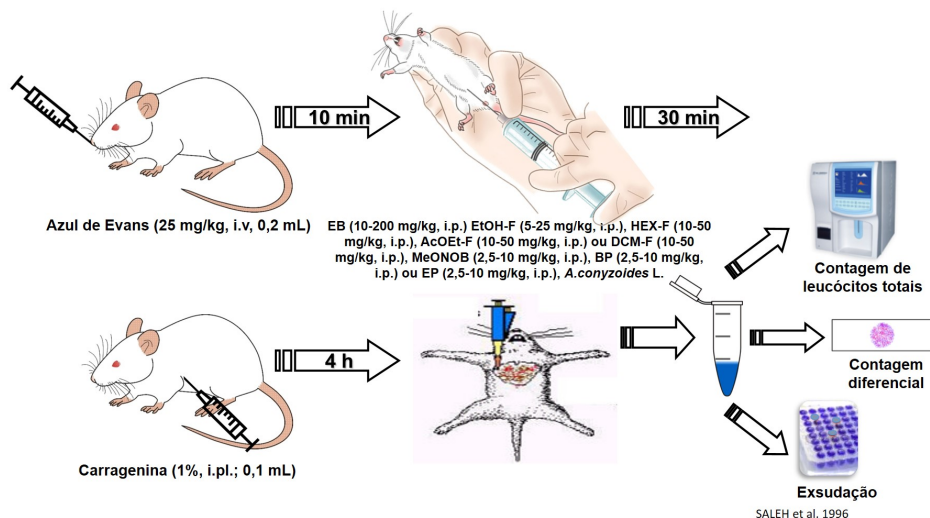


Figura 5 - Protocolo experimental para análise da curva dose-resposta utilizando o modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Inicialmente foi administrado uma solução de azul de Evans (25 mg/kg) em todos os animais por via i.v. para que as proteínas do exsudato fossem posteriormente quantificadas. Após 10 minutos da aplicação do azul de Evans, os animais receberam o tratamento com diferentes doses de extrato bruto, frações ou compostos isolados da *A. conyzoides* L. por via i.p.. Paralelamente um grupo controle recebeu tratamento com dexametasona (Dexa: 0,5 mg/kg; i.p.). Passados 30 minutos do tratamento foi administrado, por via intrapleurais, carragenina 1%, exceto nos animais do grupo salina, que receberam salina por via intrapleurais. Os animais sofreram eutanásia 4 horas após a aplicação da carragenina e os parâmetros iniciais: leucócitos totais, neutrófilos e proteínas do exsudato foram quantificados no lavado pleural. i.v.: administração intravenosa; i.p.: administração intraperitoneal; i.pl.: administração intrapleurais.

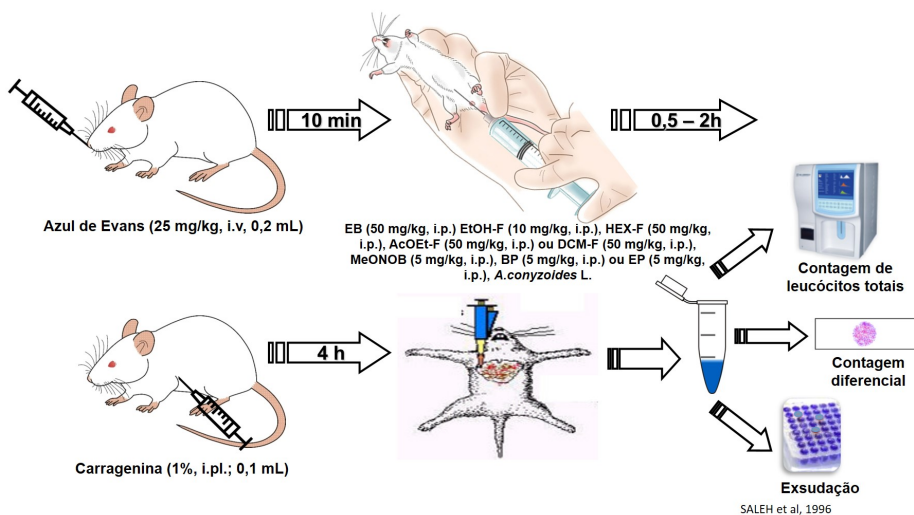


Figura 6 - Protocolo experimental para análise da curva tempo-resposta utilizando o modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Inicialmente foi administrado uma solução de azul de Evans (25 mg/kg) em todos os animais por via i.v. para que as proteínas do exsudato fossem posteriormente quantificadas. Após 10 minutos da aplicação do azul de Evans, diferentes grupos de animais receberam o tratamento com extrato bruto, frações e compostos isolados da *A. conyzoides* L., nas doses determinadas na curva dose-resposta, 0,5 h, 1 h ou 2h antes da administração da carragenina (1%, i.pl.). Paralelamente um grupo controle recebeu tratamento com dexametasona (Dexa: 0,5 mg/kg; i.p.). Os animais sofreram eutanásia 4 horas após a aplicação da carragenina e os parâmetros iniciais: leucócitos totais, neutrófilos e proteínas do exsudato foram quantificados no lavado pleural. i.v.: administração intravenosa; i.p.: administração intraperitoneal; i.pl.: administração intrapleural.

3.3.2 Determinação da concentração das proteínas do exsudato

A concentração das proteínas do exsudato foi determinada pela avaliação da concentração do corante azul de Evans no lavado da cavidade pleural, uma vez que este corante se liga

fortemente à albumina, a concentração de corante é proporcional à concentração de proteínas na amostra (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Assim, a fim de quantificar as proteínas do exsudato da cavidade pleural, em cada grupo experimental, os animais receberam injeção i.v. de solução azul de Evans (25 mg/kg), administradas 10 minutos antes do EB, frações ou compostos isolados, ou, no caso dos grupos controles negativo e positivo, 0,5 h antes da injeção i.pl. de salina e carragenina, respectivamente.

No dia dos experimentos, uma alíquota (200 μ L) do lavado da cavidade pleural foi coletada e mensurada por meio da densidade ótica em leitora de microplacas de enzimaensaio (ELISA) (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA), em 620 nm, de acordo com a metodologia descrita por Saleh, Calixto e Medeiros (1996). Para a quantificação da concentração de azul de Evans, utilizou-se uma curva padrão, determinada a partir de concentrações previamente conhecidas do corante (0,01-50 μ g/mL) e suas respectivas densidades óticas em 620 nm. A partir destas absorbâncias, formulou-se a equação da reta que permitiu a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em μ g/mL.

3.3.3 Determinação da concentração da mieloperoxidase

As amostras do lavado da cavidade pleural foram coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais para a quantificação da concentração da enzima MPO, de acordo com a metodologia descrita por Rao et al, 1993. Alíquotas de 20 μ L do lavado da cavidade pleural ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos (0,7-140 mU/mL)) foram transferidos para placas de ELISA e a reação enzimática foi iniciada com a adição de 180 μ L de solução contendo 0,167 mg/mL de orto-dianisidina, 2HCl e 0,0005% de H₂O₂. Após 15 minutos de incubação, a temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30 μ L de azida sódica (1%) (RAO et al., 1993). Na etapa seguinte, as placas contendo as amostras foram lidas em leitor de ELISA (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA), em 450 nm. Curva-padrão com concentrações conhecidas da MPO (0,7-140 mU/mL) também teve suas densidades óticas

determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos em mU/mL, com o auxílio da equação da reta.

3.3.4 Determinação da concentração da adenosina desaminase

As amostras do lavado da cavidade pleural (10 μ L) foram transferidas para cubetas iniciando-se a reação enzimática com a adição da solução de tampão fosfato [pH 6,5, 250 μ L, composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e adenosina (0,5 mM)]. Após um período de incubação de 1 h a 37 °C, a reação foi bloqueada pela adição da solução (500 μ L) de fenol (1 mM), nitroprussiato de sódio (0,17 mM) e tampão alcalino (500 μ L: NaOCl : 11 mM e NaOH : 125 mM) (GIUSTI; GALANTI, 1984).

Além disso, foi utilizada uma solução padrão de sulfato de amônio com concentração conhecida, e de composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (15 mM). A avaliação da concentração da ADA no lavado da cavidade pleural foi analisada pela geração de amônia ocasionada pela quebra da adenosina que foi adicionada ao meio. A amônia gerada reage com o fenol e o hipoclorito, reação dependente de pH alcalino e catalisada pelo nitroprussiato de sódio, favorecendo a formação de um indofenol de coloração azul. A concentração de amônia é proporcional à concentração de indofenol produzido. As absorbâncias das amostras e dos padrões foram mensuradas em leitora de ELISA (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA) em 620 nm (GIUSTI; GALANTI, 1984). Os valores da concentração de ADA foram expressos em U/L.

3.3.5 Quantificação dos metabólitos do óxido nítrico

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

Para esta análise, no dia dos experimentos, 300 μ L de cada amostra do lavado da cavidade pleural foi submetida à desproteinização. Para tanto, cada amostra recebeu 30 μ L de solução de sulfato de zinco (20%), e após homogeneização em

vórtex, foram incubadas em banho de gelo por 60 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas (4°C, 300 g por 5 min), obtendo-se, desta forma, um sobrenadante límpido. Em seguida, 100 µL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para um poço de microplaca de ELISA e diluídos em solução contendo 100 µL de solução saturada de cloreto de vanádio (0,8%) (p/v) e ácido clorídrico (HCl) (3%) (p/v) e 100 µL de solução de Griess: sulfanilamida (1%) (p/v), ácido fosfórico (5%) (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v). A mistura foi incubada por 40 minutos, a 37 °C (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). Nesta reação, o cloreto de vanádio converte o NO₃⁻ em NO₂⁻ e com a adição do reagente de Griess há formação de uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades óticas em leitor de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA) em 540 nm. Curva-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO₂⁻ (0-150 µM) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo-se a quantificação dos valores de NO_x no exsudato da cavidade pleural, em µM, com auxílio da equação da reta.

3.3.6 Determinação das concentrações de IL-17A, IL-6, TNF-α, IFN-γ, MCP-1 e IL-10

Para a determinação das concentrações de IL-17A, IL-6, TNF-α, IFN-γ, MCP-1 e IL-10, imediatamente após a eutanásia dos animais, alíquotas do lavado da cavidade pleural foram coletadas e processada para a quantificação das citocinas. As dosagens foram realizadas por meio da técnica de *Cytometric bead array* (CBA) – ensaio com microesferas fluorescentes empregando-se a citometria de fluxo. O CBA consiste em uma mistura de microesferas (*beads*) com diferentes intensidades de fluorescência, de tamanho uniforme e conjugadas com anticorpos de captura específicos anti-analito de interesse (citocinas). Desta forma, as citocinas pesquisadas são capturadas pela *bead* e depois marcadas com anticorpo de detecção conjugado ao fluorocromo ficoeritrina (PE), este com fluorescência distinta da esfera. Assim, a fluorescência obtida torna-se proporcional à concentração da citocina na amostra.

Neste protocolo, foram utilizados os kits comerciais Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit e Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA).

Seguindo as orientações do fabricante, inicialmente foi preparada uma mistura com 10µL de cada tipo de *bead* presente no kit. Os tubos de aquisição foram preparados com 50 µL da mistura de *beads*, 50 µL de amostra e 50 µL de reagente de detecção (anticorpo de detecção conjugado à PE).

A seguir, os tubos foram incubados no escuro por 2 h, em temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 1 mL de tampão de lavagem em cada tubo, para posterior centrifugação (200 g por 5 min). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 300 µL de tampão de lavagem foi adicionado a cada tubo. Após a adição do tampão de lavagem, o *pellet* foi resuspenso e a amostra lida. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. As dosagens foram realizadas em citômetro de fluxo FACSVerse (BD FACSVerse™, San Jose, CA, USA) e os dados foram analisados no software FCAP Array versão 3.0., fornecido pelo mesmo fabricante. Os valores foram expressos em pg/mL.

3.3.7 Avaliação da fosforilação de p65 (p-p65 NF-κB)

Para avaliação da fosforilação da subunidade p65 de NF-κB (p-p65 NF-κB) foram utilizadas amostras de tecido pulmonar. As amostras do tecido pulmonar (100 mg) foram coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais e transferidas para tubo de *ependorf* contendo tampão de lise - Cell Lysis Buffer 5x (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA) com intuito de formar o homogenato. Conforme instruções do fabricante do kit, antes da dosagem, todas as amostras de tecido pulmonar tiveram a concentração de proteínas ajustadas para 60 µg de proteína total.

O ajuste na concentração de proteínas totais foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Lowry e colaboradores (1951) em espectrofotômetro (LOWRY et al., 1951). Para tal, à 5 µL de amostra foi adicionado 95 µL de água destilada e, posteriormente, 100 µL de reagente de Lowry (25% de CTC: carbonato de sódio: Na₂CO₃ 10%, sulfato de cobre: CuSO₄ 0,1%,

tartarato duplo Na/K 0,2%; 25% de SDS a 10%; 20% de NaOH 0,8 N e 30% de água destilada). Após uma incubação a temperatura ambiente por 10 minutos, foi adicionado 50 µL de reagente de Folin (40% de Reativo de Folin 1 N, 20% de Reativo de Folin 2 N e 40% água destilada) a cada amostra, seguido de uma incubação de 30 minutos. Após a última incubação, as amostras foram lidas em leitora de microplacas em comprimento de onda de 620 nm (Organon, Tcknica, Roseland, New Jersey, EUA). Paralelamente utilizaram-se diferentes concentrações de albumina para obter-se uma curva-padrão (0-40 µg/µL). Desta forma, para a determinação da fosforilação da proteína p65, todas as amostras foram ajustadas à concentração de 60 µg de proteína total, conforme sugerido pelos fabricantes do kit.

Neste protocolo, foi utilizado kit comercial com anticorpos monoclonais específicos para proteína p65 fosforilada humana (Instant One Phospho-NF-κB p65 (Ser536) EIA Kit - eBioscience®, San Diego, CA, USA), seguindo as orientações do fabricante. Apesar do kit ser destinado a avaliação da p65 humana, o fabricante informa que a detecção de p65 fosforilada de ratos e de camundongos é esperada. Os resultados foram expressos em modificação relativa comparada ao grupo controle negativo (salina), que representou a expressão basal da proteína p65.

3.3.8 Avaliação da fosforilação de p38 MAPK

Para avaliação da fosforilação da p38 MAPK total e fosforilada (p38 MAPK e p-p38 MAPK) foram utilizadas amostras do tecido pulmonar coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais.

Assim como realizado para avaliação da fosforilação da proteína p65, a concentração total de proteínas das amostras foi ajustada para 60 µg pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Neste protocolo experimental, foi utilizado kit comercial com anticorpos monoclonais específicos para p38 total (p38 MAP Kinase EIA kit - Invitrogen®, Camarillo, CA, USA) e p38 MAPK fosforilada humana e de camundongos (Instant One® Phospho-p38 MAPK (Tyr180/Tyr182) EIA kit - eBioscience®, San Diego, CA, USA), seguindo as orientações do fabricante dos kits utilizados. Os resultados foram expressos em modificação

relativa comparada ao grupo controle negativo (salina), que representou a expressão basal da proteína p38 MAPK total e fosforilada.

3.3.9 Avaliação da fosforilação de ERK (MAPK)

Assim como descrito para avaliação da fosforilação da proteína p65 e p38 MAPK, a concentração total de proteínas das amostras foi ajustada para 60 µg pelo método de Lowry e colaboradores (1951), e, em seguida, as amostras foram transferidas para uma placa de 96 micropoços a qual continha fixados anticorpos monoclonais específicos contra proteína ERK 1/2 fosforilada humana, de camundongos e de hamsters (Instant One Phospho-ERK 1/2 – Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187 – ELISA kit - eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA). O protocolo experimental foi realizado seguindo as orientações do fabricante do kit utilizado. Os resultados foram expressos em modificação relativa comparada ao grupo controle negativo (salina), que representou a expressão basal da proteína ERK 1/2 fosforilada.

3.4 ELABORAÇÃO DA REVISÃO SISTEMÁTICA

3.4.1 Estratégia de pesquisa

A pesquisa de dados foi realizada de 1º de fevereiro a 15 de maio de 2016, utilizando-se as bases de dados PUBMED, MEDLINE, Web of Science e Scopus, utilizando-se as palavras-chaves: '*anti-inflammatory*' e '*coumarin*' e '*in vivo*' ou '*in vitro*', limitando a busca a artigos originais, publicados em inglês entre 1º de janeiro de 2005 a 31 de dezembro de 2015.

3.4.2 Pesquisa de dados

Um único membro do grupo de pesquisa (Silvana V. G Vigil de Mello) realizou a triagem inicial no intuito de identificar possíveis estudos através da análise de títulos.

A partir dos títulos selecionados, o mesmo membro do grupo avaliou cada resumo potencialmente relevante. Na

sequência, os textos completos dos resumos selecionados foram analisados.

Os estudos foram considerados relevantes de acordo com o seguinte critério: os estudos deveriam ser conduzidos apenas com cumarinas isoladas e deveriam analisar pelo menos um parâmetro inflamatório.

A seguir, outro membro do grupo (Prof.^a Dra. Tânia Silvia Fröde) avaliou todos os resumos e textos completos dos artigos selecionados, confirmando os resultados obtidos pelo primeiro membro. Não houve discordância entre os dois membros em relação aos estudos selecionados.

3.4.3 Seleção dos estudos

A seleção dos estudos seguiu os seguintes critérios:

- a) Idioma: os textos deveriam estar publicados em inglês;
- b) Título, resumo ou texto completo deveriam mencionar as palavras “cumarinas” (ou nome científico de alguma cumarina) e/ou “inflamação” (ou nome de algum mediador inflamatório ou modelos de inflamação);
- c) Estudo *in vitro*: os estudos *in vitro* deveriam ser realizados com células humanas ou células animais;
- d) Estudo *in vivo*: os estudos *in vivo* deveriam utilizar modelos animais de inflamação;
- e) Exclusão: estudos cujo título, resumo ou texto completo não mencionavam as palavras “cumarinas” (ou nome científico de alguma cumarina) e “inflamação” (ou nome de algum mediador inflamatório ou modelos de inflamação) foram desconsiderados. Artigos de revisão e estudos cujo texto completo não se encontrava disponível também foram excluídos.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados, incluindo migração celular, concentração das proteínas do exsudato, concentrações das enzimas (MPO e ADA), de NOx e citocinas, foram expressos por média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e grupos tratados com o EB, frações,

compostos isolados ou com o fármaco de referência dexametasona foram realizadas por meio do teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) bi-caudal, complementado, quando necessário, pelo teste *post hoc* de Newman–Keuls ou do teste *t* de *Student* (não-pareado). Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® versão 3.00 (San Diego, Califórnia, EUA). Para todas as análises estatísticas, valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS OBTIDOS NOS ESTUDOS *IN VIVO* PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO

5.1.1 Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *A. conyzoides* L. sobre a migração de leucócitos e a concentração das proteínas do exsudato

O EB (50 a 200 mg/kg), a EtOH-F (10 e 25 mg/kg), a HEX-F (50 mg/kg), a AcOEt-F (50 mg/kg) e DCM-F (50 mg/kg), e os três compostos isolados, a MeONOB (5 a 10 mg/kg), a BP (5 a 10 mg/kg) e a EP (5 a 10 mg/kg), inibiram significativamente o influxo de leucócitos, às custas de neutrófilos, bem como a concentração de proteínas do exsudato ($p < 0,05$) (Figuras 7 a 11).

Os grupos controles tratados apenas com veículo (solução de salina tamponada + DMSO 10%) e o grupo controle tratado apenas com extrato bruto (10-200 mg/kg, i.p) não apresentaram sinais de toxicidade (edema ou eritema) e não apresentaram alterações significativas nos parâmetros inflamatórios analisados (dados não apresentados).

A partir dos resultados obtidos na curva dose-resposta, a dose de 50 mg/kg para o EB, a dose de 10 mg/kg para a EtOH-F, a dose de 50 mg/kg para as HEX-F, AcOEt-F e DCM-F e a dose de 5 mg/kg para os três compostos isolados foram escolhidas para os demais experimentos, uma vez que estas foram as menores doses capazes de inibir os parâmetros inflamatórios analisados.

Além disso, o estudo da curva tempo-resposta mostrou que o EB, na dose de 50 mg/kg, foi eficaz em inibir os mesmo parâmetros inflamatórios quando administrado de 0,5 h a 2 h antes da administração da carragenina. Desta forma, foi escolhido o menor tempo de tratamento prévio (0,5 h) para os experimentos posteriores (resultados não apresentados). Como esperado, a dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) inibiu significativamente todos os parâmetros inflamatórios testados ($p < 0,01$), na resposta inflamatória induzida por carragenina (Figuras 7 a 11).

5.1.2 Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *A. conyzoides* L. sobre as concentrações de MPO, ADA e NOx

O tratamento prévio (0,5 h) dos animais com EB (50 mg/kg), EtOH-F (10 mg/kg), HEX-F (50 mg/kg), AcOEt-F (50 mg/kg) e DCM-F (50 mg/kg), ou compostos isolados MeONOB (5 mg/kg), BP (5 mg/kg) e EP (5 mg/kg), causaram uma redução significativa das concentrações de MPO, ADA e NOx ($p < 0,01$) (Figuras 12 a 14).

A dexametasona também reduziu significativamente os parâmetros analisados ($p < 0,01$) (Figuras 12 a 14).

5.1.3 Efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados da *A. conyzoides* L. sobre as concentrações das citocinas IL-17A, IL-6, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 E IL-10

Neste estudo experimental foi observado que o EB (50 mg/kg), EtOH-F (10 mg/kg) e os compostos isolados MeONOB (5 mg/kg), BP (5 mg/kg) e EP (5 mg/kg) administrados via i.p., 0,5 h antes da indução da pleurisia reduziram as concentrações de IL-17A, IL-6, TNF- α e IFN- γ ($p < 0,05$) (Figuras 15 a 17). Ainda, nas mesmas condições experimentais, o EB, EtOH-F e os compostos isolados MeONOB e BP promoveram a redução significativa de MCP-1 ($p < 0,01$). Paralelamente, o EB, EtOH-F e o composto isolado BP aumentaram significativamente a concentração de IL-10 em comparação com o grupo tratado apenas com carragenina ($p < 0,01$) (Figuras 15 a 17).

A dexametasona também modificou a concentração das citocinas analisadas ($p < 0,01$) (Figuras 15 a 17).

5.1.4 Efeito dos compostos isolados da *A. conyzoides* L. 5'-metoxi nobiletina, 1,2-benzopirona e eupalestina sobre a fosforilação de p65 (NF- κ B), p38 MAPK e ERK.

Neste protocolo experimental, os compostos isolados MeONOB, BP e EP, na dose de 5 mg/kg cada, administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, reduziram significativamente a fosforilação da subunidade p65 de NF- κ B e p-p38 MAPK ($p < 0,01$) (Figuras 18 a 19). Não foi observada

alteração significativa na p38 MAPK total e na p-ERK (Figuras 19 e 20).

Semelhante ao observado com os compostos isolados, o fármaco de referência dexametasona também reduziu a fosforilação de p65 de NF- κ B e p-p38 MAPK ($p < 0.01$) (Figuras 18 a 19).

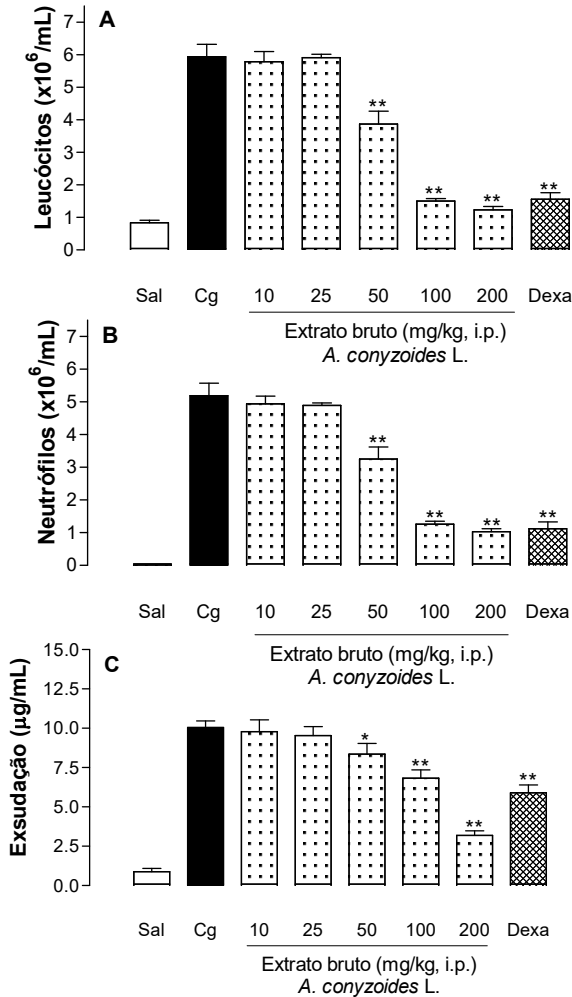


Figura 7 – Efeito do extrato bruto (10-200 mg/kg, i.p.) da *A. conyzoides* L., administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a concentração de proteínas do exsudato e o influxo de leucócitos. Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexa: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: administração via intraperitoneal. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Cada experimento foi repetido duas vezes. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

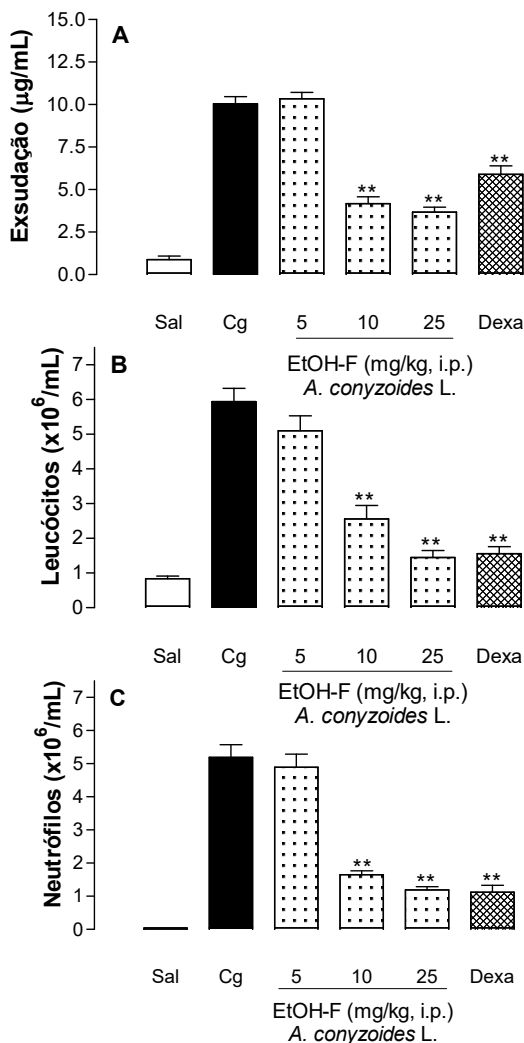


Figura 8 - Efeito da fração etanol (EtOH-F: 5-25 mg/kg, i.p.) da *A. conyzoides* L., administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a concentração das proteínas do exsudato e o influxo de leucócitos. Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexa: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: administração via intraperitoneal. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Cada experimento foi repetido duas vezes. **p < 0,01.

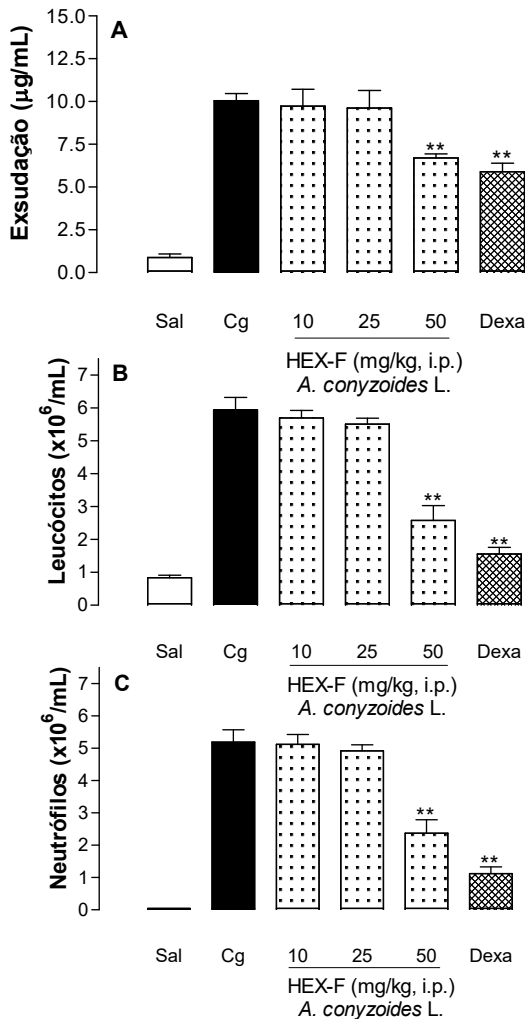


Figura 9 - Efeito da fração hexano (HEX-F: 10-50 mg/kg, i.p.) da *A. conyzoides* L., administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a concentração das proteínas do exsudato e o influxo de leucócitos. Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexa: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: administração via intraperitoneal. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Cada experimento foi repetido duas vezes. ** $p < 0,01$.

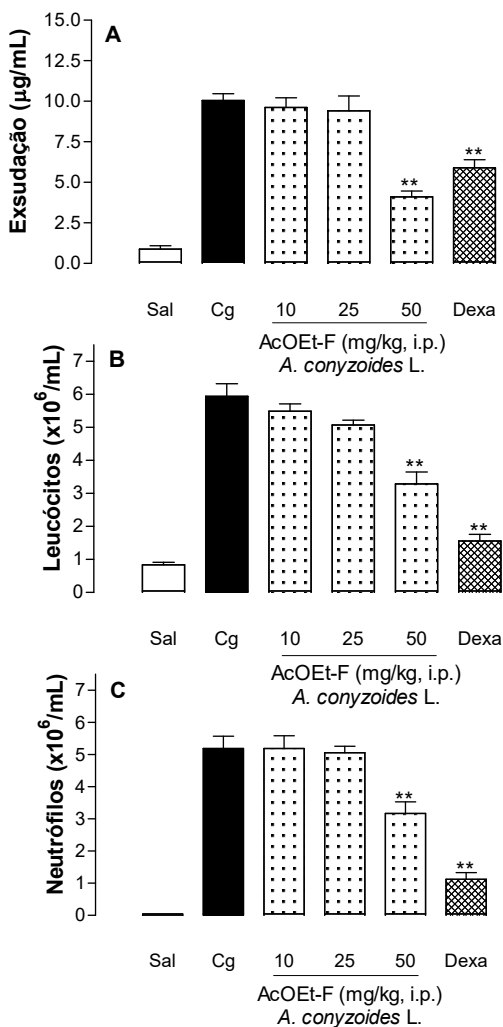


Figura 10 - Efeito da fração acetato de etila (AcOEt-F: 10-50 mg/kg, i.p.) da *A. conyzoides* L., administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a concentração das proteínas do exsudato e o influxo de leucócitos. Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexa: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: administração via intraperitoneal. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Cada experimento foi repetido duas vezes. **p < 0,01.

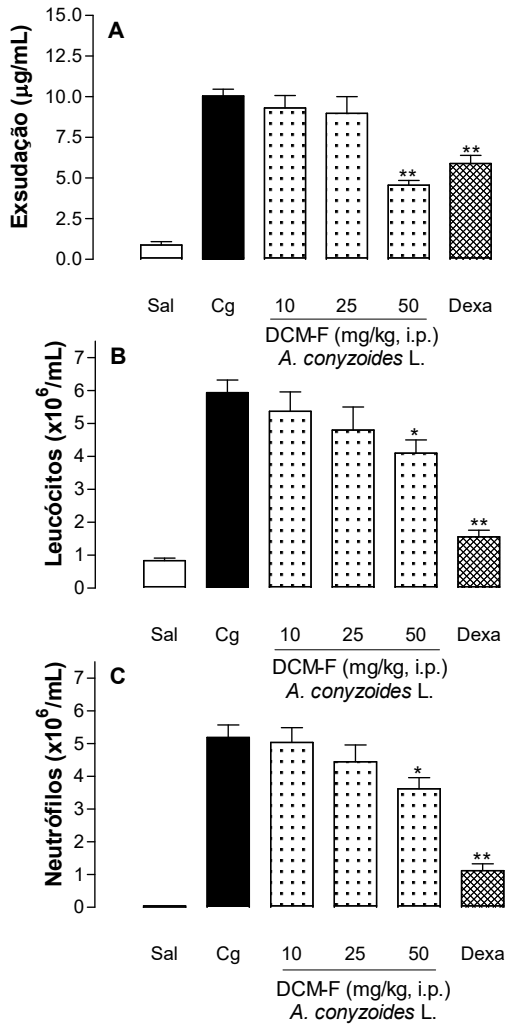


Figura 11 - Efeito da fração diclorometano (DCM-F: 10-50 mg/kg, i.p.) da *A. conyzoides* L., administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a concentração das proteínas do exsudato e o influxo de leucócitos. Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexa: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: administração via intraperitoneal. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Cada experimento foi repetido duas vezes. **p < 0,01 e *p < 0,05.

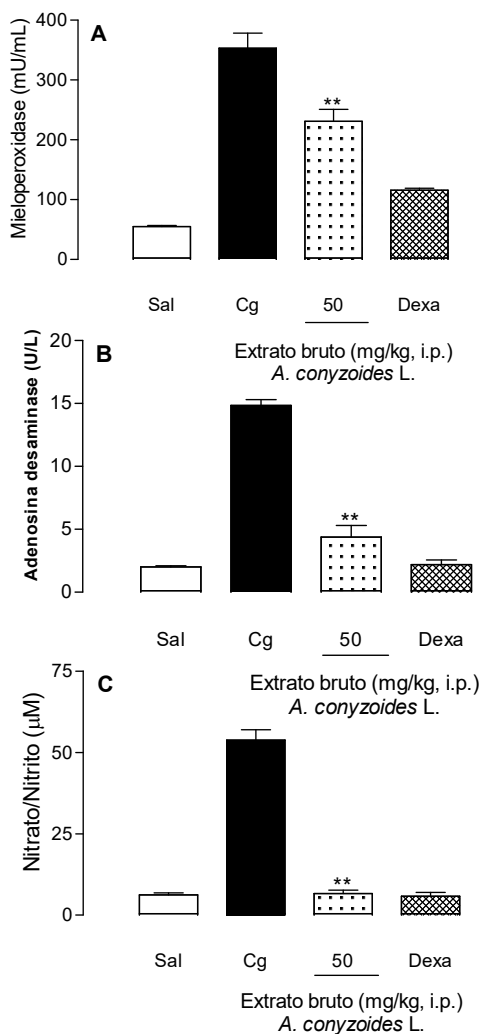


Figura 12 - Efeito do extrato bruto (50 mg/kg, i.p.) da *A. conyzoides* L., administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina sobre as concentrações de A) mieloperoxidase (MPO); B) adenosina desaminase (ADA); e C) metabólitos do óxido nítrico (NOx). Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexa: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: via intraperitoneal. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Cada experimento foi repetido duas vezes. ** $p < 0,01$.

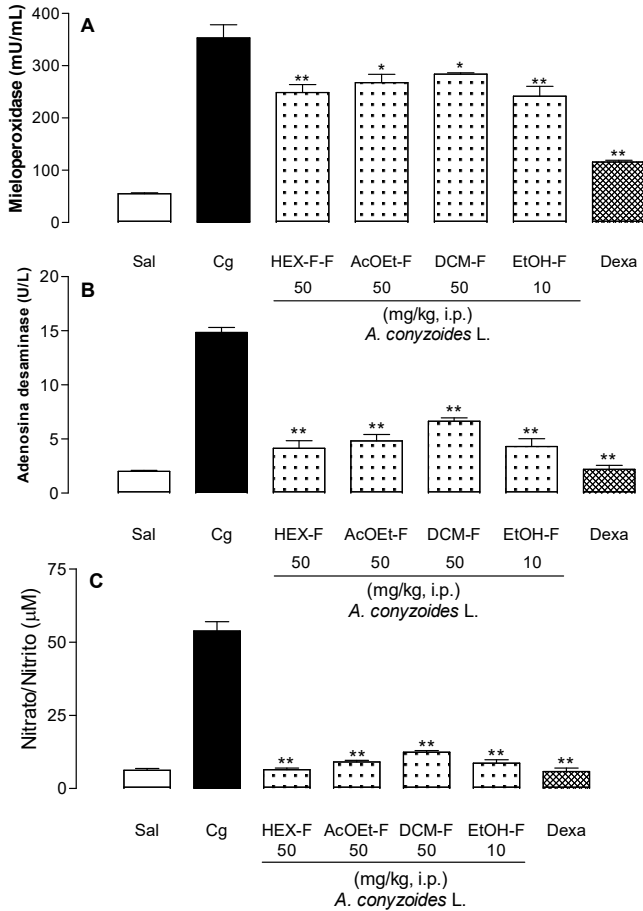


Figura 13 - Efeito das frações hexano (HEX-F: 50 mg/kg), acetato de etila (AcOEt-F: 50 mg/kg), diclorometano (DCM-F: 50 mg/kg) e etanol (EtOH-F: 10 mg/kg) da *A. conyzoides* L., administradas 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina sobre as concentrações de A) mieloperoxidase (MPO); B) adenosina desaminase (ADA), e C) metabólitos do óxido nítrico (NOx). Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexa: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: via intraperitoneal. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Cada experimento foi repetido duas vezes. Cada experimento foi repetido duas vezes. **p < 0,01 e *p < 0,05.

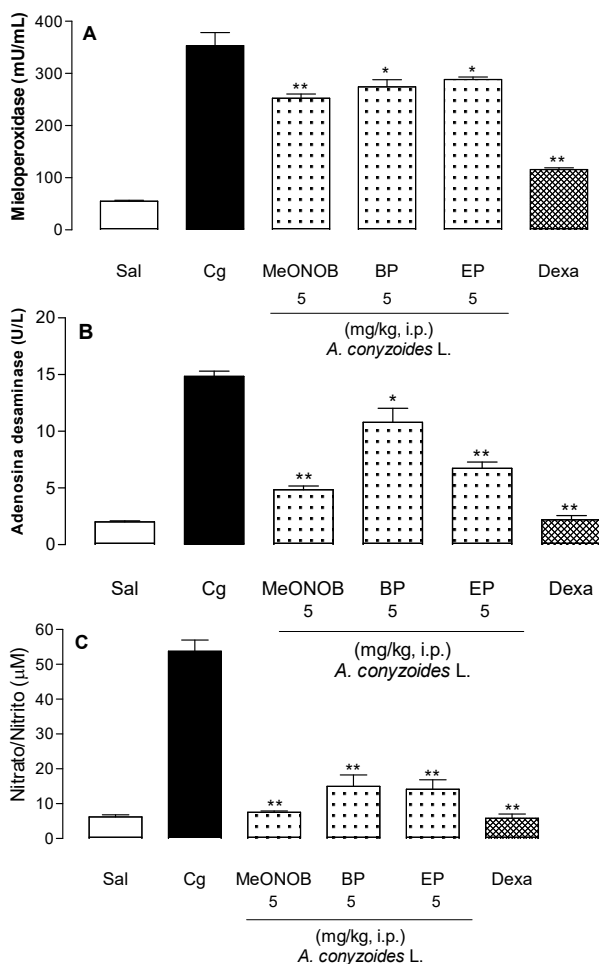


Figura 14 - Efeito dos compostos isolados da *A. conyzoides* L. 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg), administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina sobre as concentrações de A) mieloperoxidase (MPO); B) adenosina desaminase (ADA), e C) metabólitos do óxido nítrico (NOx). Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexa: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: via intraperitoneal. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Cada experimento foi repetido duas vezes. **p < 0,01 e *p < 0,05.

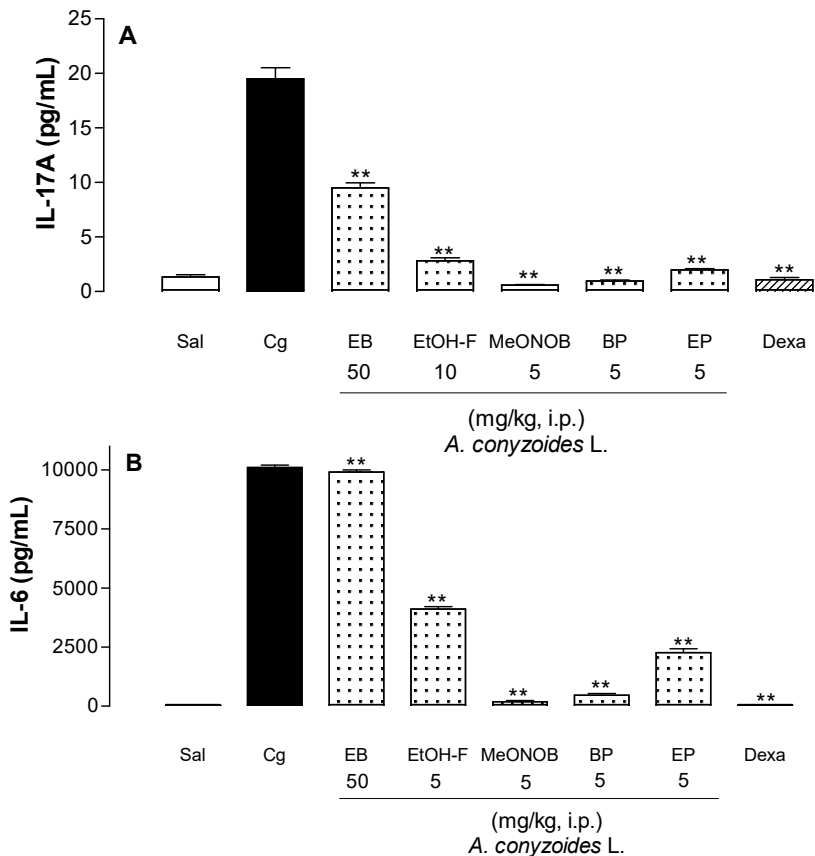


Figura 15 - Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg, i.p), fração etanol (EtOH-F: 10 mg/kg, i.p.) e compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg) da *A. conyzoides* L., administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre as concentrações de A) IL-17A; e B) IL-6. IL-17A: interleucina 17A; IL-6: interleucina 6; Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexa: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: administração via intraperitoneal. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Cada experimento foi repetido duas vezes. ** $p < 0,01$.

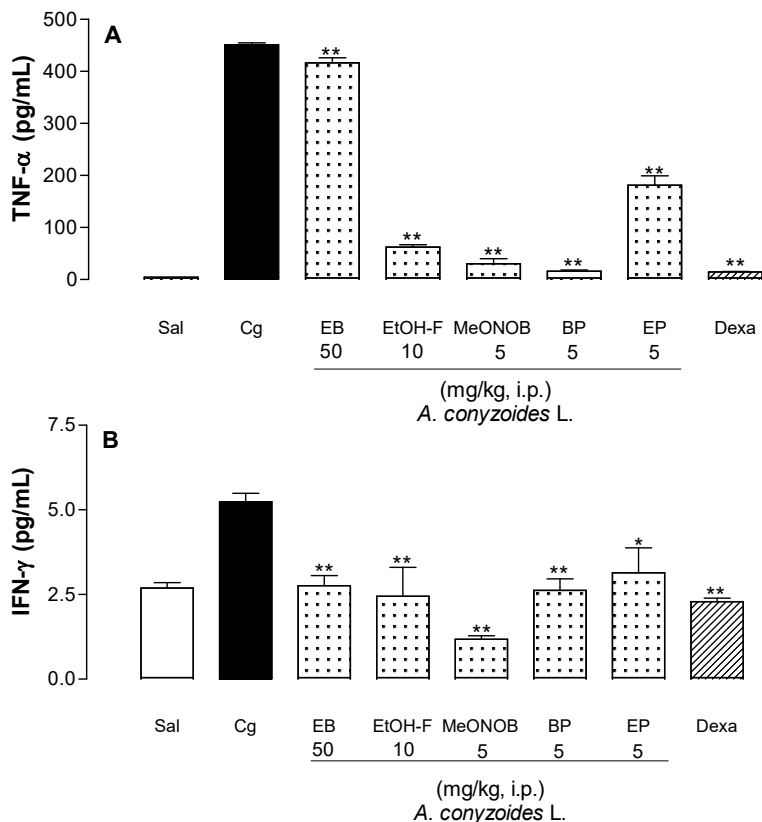


Figura 16 - Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg, i.p.), fração etanol (EtOH-F: 10 mg/kg, i.p.) e compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg) da *A. conyzoides* L., administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre as concentrações de A) TNF- α ; e B) IFN- γ . TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IFN- γ : interferon gama. Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexa: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: administração via intraperitoneal. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Cada experimento foi repetido duas vezes. **p < 0,01 e *p < 0,05.

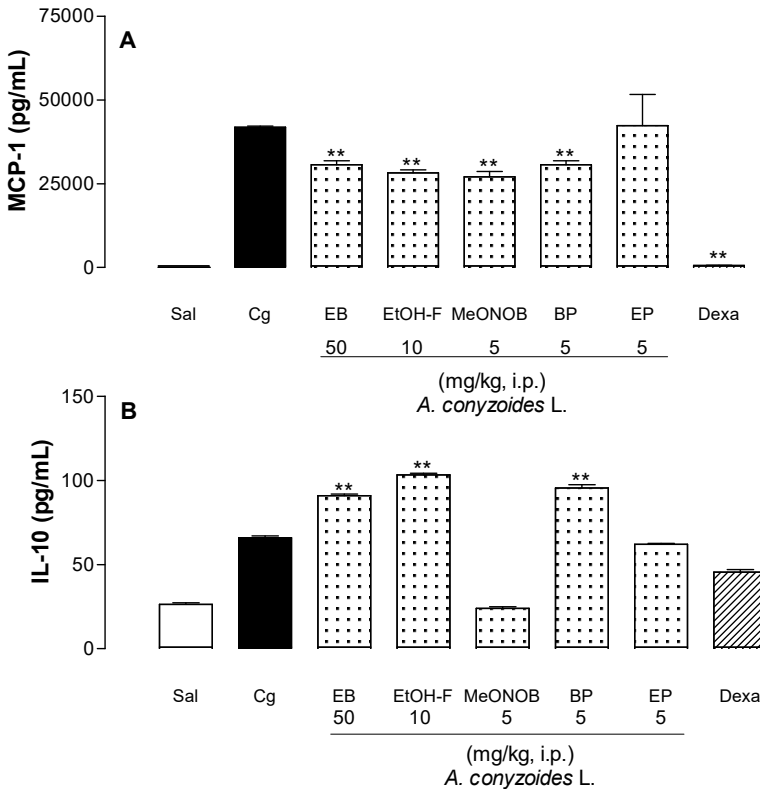


Figura 17 - Efeito do extrato bruto (EB: 50 mg/kg, i.p), fração etanol (EtOH-F: 10 mg/kg, i.p.) e compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg) da *A. conyzoides* L., administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre as concentrações de A) MCP-1; e B) IL-10. MCP-1: proteína quimiotática de monócito 1; IL-10: interleucina 10. Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexa: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: administração via intraperitoneal. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Cada experimento foi repetido duas vezes. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

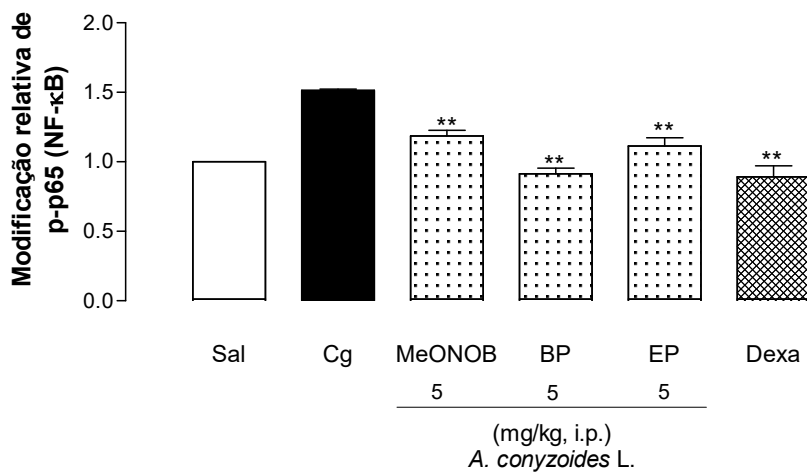


Figura 18 - Efeito dos compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg) da *A. conyzoides* L., administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a fosforilação da subunidade p65 de NF-κB. Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexta: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: administração via intraperitoneal. Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 5 animais. O experimento foi repetido duas vezes**p < 0,01.

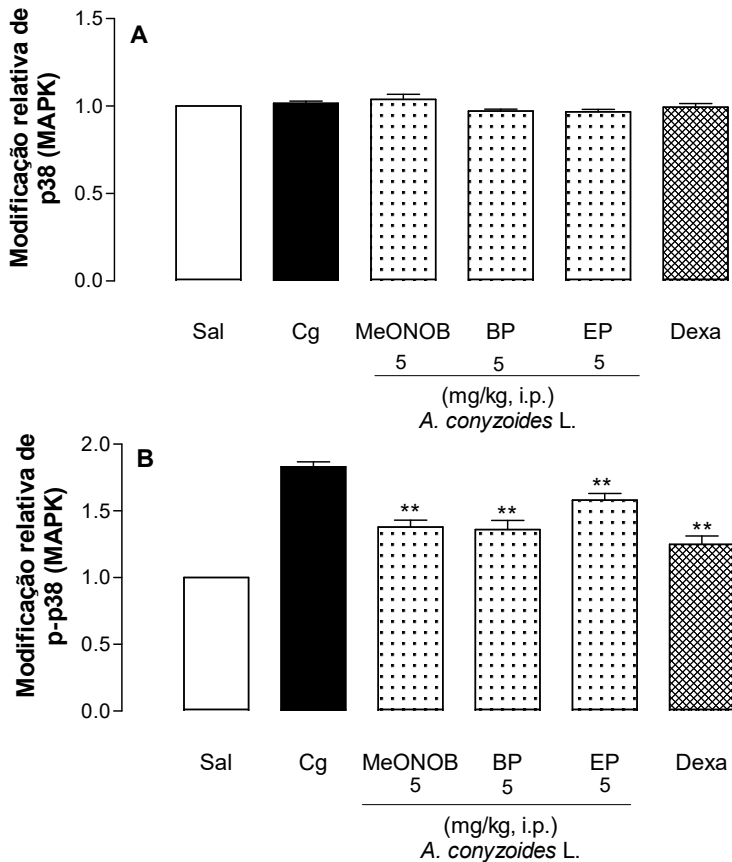


Figura 19 - Efeito dos compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg) da *A. conyzoides* L., administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a fosforilação de: A) p38 MAPK total; e B) p38 MAPK fosforilada. Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexa: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: administração via intraperitoneal. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Cada experimento foi repetido duas vezes. ** $p < 0,01$.

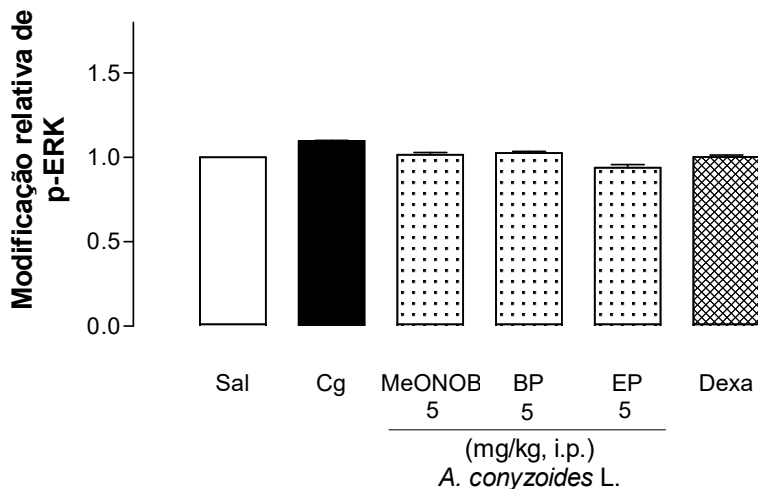


Figura 20 - Efeito dos compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB: 5 mg/kg), 1,2-benzopirona (BP: 5 mg/kg) e eupalestina (EP: 5 mg/kg) da *A. conyzoides* L., administrados 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, sobre a fosforilação ERK fosforilada. Sal: grupo controle negativo (animais tratados apenas com solução salina (NaCl 0,95%)); Cg: grupo controle positivo (animais tratados apenas com Cg 1%); Dexta: animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) + Cg; i.p.: administração via intraperitoneal. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. O experimento foi repetido duas vezes. **p < 0,01.

5.2 RESULTADOS OBTIDOS NA REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DAS CUMARINAS

5.2.1 Estudos incluídos na revisão sistemática

Após a pesquisa em bases de dados, foram identificados 423 títulos de artigos com potencial relevância, baseados nos termos pesquisados. Seguindo o protocolo de triagem (Figura 21), foram descartados os artigos duplicados e aqueles estudos cujo título ou o resumo não atendiam os critérios e inclusão, restando 125 artigos. Destes 125, após a exclusão de artigos de revisão, estudos fora do escopo ou artigos cujo texto completo não se encontrava disponível *online*, restaram 67 artigos, que foram incluídos nesta revisão. O diagrama de fluxo que detalha o protocolo de triagem está ilustrado na Figura 21.

5.2.2 Toxicidade das cumarinas

Estudos de toxicidade *in vitro* são uma importante ferramenta para avaliação da segurança e tolerabilidade de substâncias. Entre os 67 estudos selecionados, o efeito tóxico das cumarinas foi avaliado em 26 (38,8%) (Tabelas 1 e 2), dos quais 25 (96,2%) não registraram qualquer efeito tóxico destas substâncias sobre as linhagens de células utilizadas.

5.2.3 Ensaios *in vivo* e *in vitro*

Dentre os 67 estudos relevantes (selecionados após a revisão dos textos completos), 24 (35,8%) foram conduzidos apenas com ensaios *in vitro*, 13 (19,4%) utilizaram apenas ensaios *in vivo*, e 30 estudos (44,8%) foram conduzidos com ensaios *in vitro* e *in vivo* (Tabelas 1 e 2).

5.2.3.1 Estudo das cumarinas *in vivo*

De um total de 43 estudos que realizaram ensaios *in vivo*, 20 (46,5%) utilizaram apenas camundongos, 22 (51,2%) utilizaram apenas ratos e 1 (2,3%) utilizou camundongos e ratos (Tabelas 1 e 2).

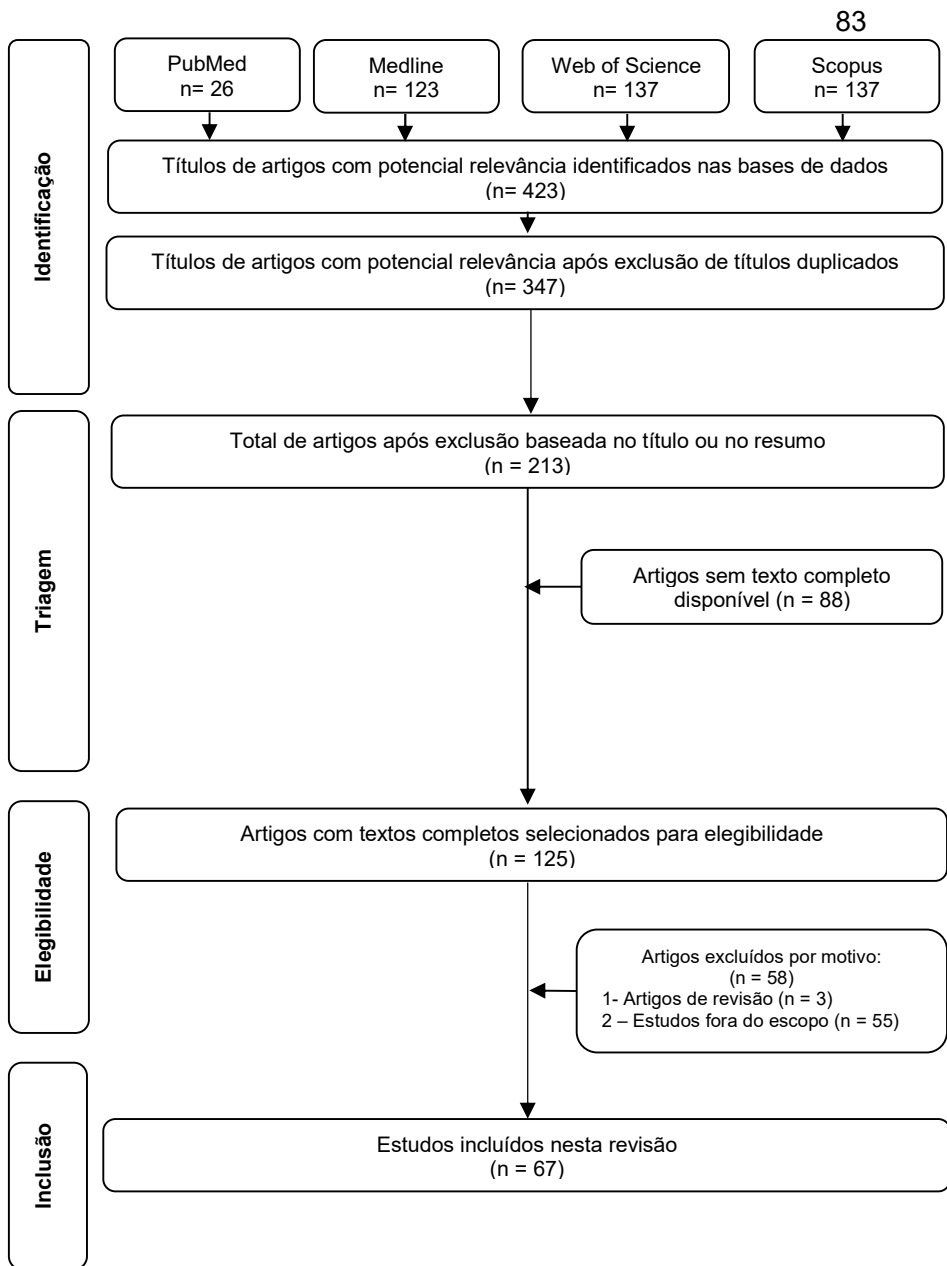


Figura 21 – Protocolo de triagem para seleção dos estudos incluídos na revisão sistemática sobre o efeito anti-inflamatório das cumarinas.

Os modelos experimentais de inflamação mais utilizados nos estudos pesquisados foram: o modelo de edema de pata em ratos (23,9%), o modelo de inflamação pulmonar (21,7%) e de edema de orelha (10,9%), em camundongos, e o modelo de colite (8,7%) e artrite (8,7%), em ratos. Apenas 4,4% dos estudos utilizaram o modelo de dermatite atópica, em camundongos (Tabelas 1 e 2).

Ainda, 23,8% dos estudos incluídos utilizaram outros modelos experimentais de inflamação em ratos (modelo de inflamação pulmonar, modelo de anafilaxia cutânea e modelo de lesão de retina induzida por isquemia e reperfusão) ou em camundongos (modelo de colite, modelo de artrite, modelo de nefropatia por IgA, modelo de formação de granuloma induzido por pellet de algodão, modelo de isquemia global cerebral, modelo de diabetes e modelo de choque séptico) (Tabelas 1 e 2).

5.2.3.2 Estudos das cumarinas *in vitro*

Dos 54 estudos que realizaram ensaios *in vitro*, 16 (29,6%) utilizaram apenas linhagens de células humanas, 30 (55,6%) apenas linhagens de células animais, 3 (5,5%) utilizaram células humanas e animais, e 5 (9,25%) não utilizaram cultura de células (Tabelas 1 e 2).

Entre os 19 estudos que realizaram ensaios com linhagens de células humanas, 4 (19,0%) utilizaram neutrófilos de doadores adultos voluntários e saudáveis e 3 (15,8%) utilizaram células de linhagem monocíticas humanas (THP-1). Os outros 12 estudos (63,2%) utilizaram outras linhagens de células, incluindo células endoteliais primárias isoladas de cordão umbilical humano, linhagem de linfócitos T imortalizada (Jurkat), linhagem neoplásica humana (U937), fibroblastos pulmonares humanos (HFL-1 e MRC-5), células de leucemia eosinofílica (EoL-1), linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), queratinócitos humanos (HaCaT), células epiteliais orais humanas (GMSM-K), fibroblastos gengivais humanos (HGF-1), células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2 e Hep3B), e células epiteliais pulmonares humanas (A549) (Tabelas 1 e 2).

Trinta e três estudos utilizaram diferentes linhagens de células animais. A linhagem RAW264.7 (macrófagos murino) foi utilizada em 12 estudos (36,4%), enquanto a linhagem de

macrófagos peritoneais murinos foi utilizada em 5 estudos (15,2%) e esplenócitos murinos em 3 (9,1%). Outros 13 estudos (39,4%) utilizaram outras linhagens de células animais, entre elas: macrófagos alveolares de ratos (NR8383), eritrócitos de ratos, células de leucemia basofílica de ratos (RBL-2H3), leucócitos polimorfonucleares de ratos, macrófagos murinos (J774A.1), células mesengiais murinas (CRL 1927), células da micróglia murina BV2, macrófagos alveolares murinos (MH-S), fibroblastos embrionários de camundongos albinos Swiss 3T3, linfócitos e esplenócitos de camundongos C57BL/6, e células Tregs isoladas do baço de camundongos não-diabéticos ou diabéticos não obesos (Tabelas 1 e 2).

5.2.4 Cumarinas e a resposta anti-inflamatória

5.2.4.1 Cumarinas e inibição de células inflamatórias

Dos 67 estudos selecionados para esta revisão, o efeito das cumarinas sobre as células inflamatórias foi avaliado em 15 estudos (22,4%) (Tabelas 1 e 2).

Destes 15 estudos, 9 (60%) avaliaram o efeito das cumarinas sobre leucócitos totais, 2 (13,3%) avaliaram o efeito das cumarinas sobre leucócitos totais e infiltração e acúmulo de neutrófilos, e 1 estudo (6,66%) avaliou efeito das cumarinas sobre leucócitos totais e infiltração e acúmulo de neutrófilos e macrófagos (Tabelas 1 e 2).

Paralelamente, o efeito das cumarinas sobre macrófagos alveolares e intersticiais, células dendríticas e neutrófilos foi avaliado em apenas 1 estudo (6,66%). Ainda, o efeito das cumarinas sobre macrófagos e células T ou CD4+CD25+Foxp3+ Tregs foi avaliado em um estudo cada (6,66%) (Tabelas 1 e 2).

Os dados da literatura pesquisada mostraram que as cumarinas inibiram a infiltração e o acúmulo de leucócitos, neutrófilos e macrófagos no local da inflamação. Paralelamente, as cumarinas promoveram um aumento da diferenciação de células Treg no baço.

5.2.4.2 *Cumarinas e a inibição da mieloperoxidase*

Dos 67 estudos selecionados, o efeito das cumarinas sobre a atividade da MPO foi avaliado em 11 (16,4%) estudos conduzidos com ensaios *in vivo*. De acordo com os dados pesquisados, a atividade da MPO foi inibida pelas cumarinas (Tabelas 1 e 2).

5.2.4.3 *Cumarinas e a inibição das moléculas de adesão*

Entre os 67 estudos relevantes selecionados para esta revisão, o efeito das cumarinas sobre as moléculas de adesão foi avaliado em 5 estudos conduzidos com ensaios *in vitro* (7,5%) (Tabelas 1 e 2).

Destes 5 estudos, 2 (40%) avaliaram o efeito dos compostos apenas sobre a concentração de ICAM-1, 1 (20%) sobre a concentração de ICAM-1 e VCAM-1, e 2 (40%) sobre a concentração de integrinas ($\alpha_L\beta_2$ e $\alpha_M\beta_2$ ou CD11b) (Tabelas 1 e 2).

Dos estudos conduzidos com ensaios *in vivo*, apenas 1 estudo (1,5%) avaliou o efeito das cumarinas sobre a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 (Tabelas 1 e 2). De acordo com os estudos incluídos nesta revisão, as cumarinas inibiram a concentração de VCAM-1 e de integrinas, e inibiram a concentração e a expressão de ICAM-1.

5.2.4.4 *Cumarinas e a inibição de edema*

Entre os 43 estudos que utilizaram modelos animais, o efeito das cumarinas sobre edema (orelha, pata, pulmão ou cólon) foi avaliado em 20 estudos (46,5%) (Tabelas 1 e 2).

Em todos os estudos incluídos nesta revisão, a formação de edema foi inibida pelas cumarinas.

5.2.4.5 *Cumarinas e a inibição do estresse oxidativo*

Dos 67 estudos selecionados, o efeito antioxidante das cumarinas foi avaliado em 15 (22,4%) (Tabelas 1 e 2).

Destes 15 estudos, a redução de ânion superóxido foi avaliada em 6 (40%), a habilidade das cumarinas de neutralizar

(*scavenge*) ERO foi avaliada em 4 estudos (26,7%), a peroxidação lipídica foi avaliada em 3 (20%), atividade de xantina oxidase em 1 (6,7%), e a redução do conteúdo de glutatona (associada com dano oxidativo) em 4 estudos (23,5%) (Tabelas 1 e 2). Os 4 estudos que analisaram o conteúdo de glutatona também avaliaram simultaneamente a atividade da fosfatase alcalina (Tabelas 1 e 2). De acordo com os estudos incluídos nesta revisão, as cumarinas demonstraram potencial atividade antioxidante através da redução de ânion superóxido, inibição da peroxidação lipídica, da atividade de xantina oxidase e pela neutralização de ERO. Paralelamente, as cumarinas promoveram o aumento do conteúdo de glutatona e inibição da fosfatase alcalina.

5.2.5 Cumarinas e a inibição de outros mediadores da inflamação

5.2.5.1 Cumarinas e a inibição do óxido nítrico

Dos 67 trabalhos selecionados, o efeito das cumarinas sobre a concentração de NOx foi analisado em 14 estudos (20,9%) conduzidos com ensaios *in vitro* (Tabelas 1 e 2). Destes 14 estudos, 2 (14,3%) também realizaram esta análise em seus estudos *in vivo* (Tabelas 1 e 2).

Paralelamente, NOS2 foi avaliada em 7 estudos conduzidos com ensaios *in vitro* (10,4%) (Tabelas 1 e 2). Destes 7 estudos, a concentração de enzima foi avaliada em 3 (42,9%) e a expressão da enzima em 4 estudos (57,1%). Ainda, 6 estudos (85,7%) avaliaram a concentração de NOS2 e NOx no mesmo experimento (Tabelas 1 e 2).

Os dados da literatura pesquisada mostraram que as cumarinas reduziram a concentração de NOx e a concentração e expressão de NOS2.

5.2.5.2 Cumarinas e a inibição da ciclooxigenase, lipoxigenase e seus produtos

Dentre os 67 estudos selecionados, o efeito das cumarinas sobre COX-2 foi avaliado em 8 estudos (11,9%) (Tabelas 1 e 2). Destes 8, a expressão de COX-2 foi avaliada em 6 estudos

(75%) conduzidos com ensaios *in vitro* e em 2 estudos (25%) conduzidos com ensaios *in vivo*. Dos 6 estudos que analisaram COX-2 *in vitro*, 4 (66,7%) também analisaram o efeito das cumarinas sobre a atividade de COX-1 no mesmo experimento (Tabelas 1 e 2).

De acordo com os dados da literatura selecionada, as cumarinas inibiram a expressão e/ou a atividade de COX-2. Paralelamente, não foi observado nenhum efeito das cumarinas sobre a atividade de COX-1.

Em relação aos produtos da COX, o efeito das cumarinas sobre a concentração de PGE₂ foi avaliada em 6 (9,0%) dos 67 trabalhos selecionados (Tabelas 1 e 2). Destes 6 estudos, 4 (66,6%) foram conduzidos apenas com ensaios *in vitro*, 1 (16,7%) apenas com ensaio *in vivo*, e 1 (16,7%) com ensaios *in vitro* e *in vivo* (Tabelas 1 e 2). Em todos os estudos, as cumarinas se mostraram efetivas em inibir a concentração de PGE₂.

Além da PGE₂, também foi avaliado o TXB₂. Dos 67 estudos selecionados, o efeito das cumarinas sobre TXB₂ foi avaliado em apenas 1 estudo (1,5%) (Tabelas 1 e 2). De acordo com a literatura pesquisada, as cumarinas foram capazes de diminuir a concentração de TXB₂.

Em relação à enzima lipoxigenase e seus produtos, dos 67 estudos selecionados, o efeito das cumarinas sobre a enzima 5-LOX, LTB₄ e FLAP foi avaliado em 3 (4,5%), 2 (3,0%), e 1 (1,5%) estudos conduzidos apenas com ensaios *in vitro*, respectivamente (Tabelas 1 e 2).

Os dados da literatura selecionada mostraram que as cumarinas inibiram a atividade 5-LOX, a produção de LTB₄ e a atividade de FLAP.

5.2.5.3 Cumarinas e a inibição de citocinas

Entre os 67 estudos relevantes, o efeito das cumarinas sobre a concentração de citocinas foi avaliado em 36 (53,7%) (Tabelas 1 e 2). As principais citocinas testadas foram TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

Dos 36 estudos que dosaram citocinas, o TNF- α foi analisado em 25 (69,4%) (Tabelas 1 e 2). Destes 25, 12 (48%) foram conduzidos apenas com ensaios *in vitro*, 6 (24%) apenas

com ensaios *in vivo* e 7 (28%) conduziram seus estudos com ensaios *in vitro* e *in vivo* (Tabelas 1 e 2).

Paralelamente, a IL-6 foi avaliada em 24 estudos (66,7%) (Tabelas 1 e 2). Destes 24, 12 (50%) conduziram seus estudos apenas com ensaios *in vitro*, 7 (29,2%) apenas com ensaios *in vivo*, e 5 (20,8%) com ensaios *in vitro* e *in vivo* (Tabelas 1 e 2).

A citocina IL-1 β , por sua vez, foi mensurada em 16 estudos (44,4%) (Tabelas 1 e 2). Destes 16, 6 (37,5%) conduziram seus estudos apenas com ensaios *in vitro*, 5 (31,25%) apenas com ensaios *in vivo*, e 5 (31,25%) utilizaram tanto ensaios *in vitro* como *in vivo* (Tabelas 1 e 2).

Dos 36 estudos que dosaram citocinas, o efeito das cumarinas sobre IFN- γ , IL-4, MCP-1, TGF- β , IL-8, IL-2 e IL-10 foi avaliado respectivamente em 8 (22,2%), 7 (19,4%), 6 (16,7%), 5 (13,9%), 5 (13,9%), 4 (11,1%) e 4 (11,1%) estudos (Tabelas 1 e 2).

Dos 8 estudos que mensuraram IFN- γ , as coumarinas reduziram a concentração desta citocina em 7 estudos (87,5%). Paralelamente, dos 7 estudos que avaliaram IL-4, em 6 (85,7%) as coumarinas foram capazes de reduzir a concentração desta citocina.

Por outro lado, todos os 6 estudos que mensuraram MCP-1 observaram que as cumarinas reduziram a concentração da quimiocina. Entretanto, dos 5 que avaliaram TGF- β , 4 (80%) mostraram que as cumarinas inibiram a concentração bem como a expressão desta citocina. Os resultados de todos os estudos que avaliaram IL-8 e IL-2 mostraram que as cumarinas reduziram as concentrações destas interleucinas. Ainda, 75% dos estudos que mensuraram IL-10 observaram que as cumarinas aumentaram a concentração desta citocinas.

Outras citocinas, proteínas induzidas por citocinas ou quimiocinas envolvidas no processo inflamatório foram testadas em alguns estudos, incluindo IL-13 (8,3%), IFN- β (2,8%), IL-17 (2,8%), IL-23 (2,8%), CXCL12 (2,8%), CXCL1 (2,8%), CXCL2 (MIP-2) (2,8%), Eotaxin (8,3%), CCL17 (2,8%), FGF-2 (2,8%) e VEGF (2,8%). Em todos os estudos selecionados, as cumarinas reduziram a concentração destes mediadores.

5.2.5.4 *Cumarinas e a inibição das metaloproteinases de matriz*

Dos 67 estudos selecionados, o efeito das cumarinas sobre MMP foi avaliado em 3 estudos (4,5%) (Tabelas 1 e 2). Destes 3 estudos, 2 (66,7%) foram conduzidos apenas com ensaios *in vitro* e avaliaram a concentração de MMP-2 e MMP-9 e 1 (33,3%) foi conduzido com ensaios *in vivo* e avaliou a concentração apenas de MMP-9 (Tabelas 1 e 2). Os dados pesquisados mostraram que as cumarinas foram capazes de diminuir a concentração de MMP.

5.2.6 Cumarinas e a inibição das vias de sinalização da resposta inflamatória

5.2.6.1 *Cumarinas e a inibição de MAPK*

Entre os 67 estudos incluídos nesta revisão, o efeito das cumarinas sobre a fosforilação de MAPK foi avaliada em 8 estudos conduzidos apenas com ensaios *in vitro* (11,9%) (Tabelas 1 e 2).

Destes 8 estudos, 4 (50%) avaliaram a fosforilação de p38 MAPK, ERK e JNK no mesmo experimento, 1 (12,5%) avaliou a fosforilação de p38 MAPK e ERK, 2 (25%) avaliaram a fosforilação apenas de p38 MAPK e 1 (12,5%) apenas de ERK (Tabelas 1 e 2).

A concentração de proteínas ou a fosforilação de outras MAPK, incluindo MEK-1 (12,5%), TAK-1 (12,5%) e PKC α (12,5%), foram avaliadas em um pequeno número de estudos (Tabelas 1 e 2).

Os dados da literatura mostraram que as cumarinas foram efetivas em inibir a fosforilação de p38 MAPK, ERK e JNK.

5.2.6.2 *Cumarinas e a inibição de NF- κ B*

Dos 67 estudos selecionados, o efeito das cumarinas sobre a concentração ou expressão de NF- κ B foi avaliado em 15 estudos (22,4%) (Tabelas 1 e 2).

Destes 15 estudos, 11 (73,3%) conduziram seus experimentos apenas com ensaios *in vitro*, 1 (6,7%) com ensaios *in vitro* e *in vivo* e 3 (20%) avaliaram a concentração ou

expressão de NF- κ B apenas em seus ensaios *in vivo* I (Tabelas 1 e 2).

Ainda, 6 (40%) destes 15 estudos também avaliaram no mesmo experimento a fosforilação de I κ B α em seus estudos conduzidos com ensaios *in vitro* e 1 (6,7%) em seus estudos conduzidos com ensaios *in vivo* (Tabelas 1 e 2).

Por outro lado, apenas 3 (20%) dos 15 estudos avaliaram o efeito das cumarinas sobre a fosforilação de IKK α / β (Tabelas 1 e 2).

Paralelamente, dos 67 estudos, 2 (3,0%) avaliaram o efeito das cumarinas sobre TLR4 e 1 (1,5%) avaliou o efeito destes compostos sobre Myd88, TRIF, TRAM, e IRF-3 em seus estudos *in vivo*. Por outro lado, 1 estudo (1,5%) conduzido apenas com ensaios *in vitro* avaliou o efeito das cumarinas sobre a ubiquitinação de TRAF6 e outro (1,5%) sobre TNFAIP3 (Tabelas 1 e 2).

De acordo com a literatura pesquisada, as cumarinas promoveram inibição da fosforilação de NF- κ B, de I κ B α e de IKK α / β , inibiram a expressão/concentração de TLR4, a expressão de Myd88, TRIF, TRAM e IRF-3 e também a ubiquitinação de TRAF6. Adicionalmente, as cumarinas ainda aumentaram as concentrações de TNFAIP3.

5.2.7 Cumarinas e outros fatores de transcrição

5.2.7.1 *Foxp3*

Dos 67 estudos incluídos nesta revisão, o efeito das cumarinas sobre *Foxp3* foi avaliado em 2 (3,0%) (Tabelas 1 e 2). Os dados da literatura pesquisada mostraram que as cumarinas aumentaram a expressão e a concentração de *Foxp3*.

5.2.7.2 *NFAT*

Dos 67 estudos escolhidos, o efeito das cumarinas sobre *NFAT* foi avaliado em apenas 1 estudo (1,5%) conduzido apenas com ensaios *in vitro* (Tabelas 1 e 2). De acordo com a literatura selecionada, as cumarinas reduziram as concentrações de *NFAT*.

5.2.7.3 *Nrf2*

Entre os 67 estudos relevantes, o efeito das cumarinas sobre Nrf2 foi avaliado em 1 estudo (1,5%) conduzido com ensaios *in vitro* e *in vivo* (Tabelas 1 e 2).

A literatura pesquisada mostrou que as cumarinas aumentaram as concentrações de Nrf2.

5.2.7.4 *Smad*

Dentre os 67 estudos selecionados, o efeito das cumarinas sobre as proteínas Sma2/3 e Smad7 foi avaliada em apenas 1 estudo (1,5%) conduzido apenas com ensaios *in vivo* (Tabelas 1 e 2). Os dados da literatura mostraram que as cumarinas inibiram a fosforilação de Smad2/3 e aumentam a concentração de Smad7.

5.2.7.5 *ROR γ T*

Dos 67 estudos relevantes, o efeito das cumarinas sobre a concentração de ROR γ T foi avaliado em 1 estudo (1,5%) conduzido apenas com ensaios *in vivo* (Tabelas 1 e 2). Os dados da literatura mostraram que as cumarinas reduziram as concentrações de ROR γ T.

Tabela 1 – Relação dos principais parâmetros avaliados nos 67 estudos selecionados para a revisão sistemática sobre o efeito anti-inflamatório das cumarinas.

Parâmetros estudados	%
Ensaio <i>in vitro</i>	80,6
Células animais	61,1
• RAW264.7	36,4
• Macrófagos peritoneais murinos	15,2
• Esplenócitos murinos	9,1
Células humanas	35,1
• Neutrófilos de doadores saudáveis	19
• Células monocíticas humanas (THP-1)	15,8
• Outras linhagens (Jukart, U937, HaCat, EoL-1, HGF-1, HFL-1)	63,2
Ensaio <i>in vivo</i>	64,2
• Ratos	51,2
• Camundongos	46,5
Modelos experimentais	
• Edema de pata	23,9
• Inflamação pulmonar	21,7
• Edema de orelha	10,9
• Colite	8,7
• Artrite	8,7
• Dermatite tópica	4,4
• Outros modelos	23,8
Citocinas	53,7
• TNF- α	69,4
• IL-6	66,7
• IL-1 β	44,4
• IFN- γ	22,2
• MCP-1	16,7
• IL-10	11,1
Edema	46,5
Toxicidade	38,8
Estresse oxidativo	22,4
• Redução do ânio superóxido	40
• Neutralização de ERO	26,7
• Conteúdo de glutatona	23,5

• Peroxidação lipídica	20,0
• Xantina oxidase	6,7
Células inflamatórias	22,4
• Leucócitos totais	60
• Leucócitos totais e neutrófilos	13,3
• Leucócitos totais, neutrófilos e macrófagos	6,66
• Linfócito T regulatório	6,66
Óxido nítrico	20,9
• NOS2	10,4
MPO	16,4
COX-2	11,9
• PGE2	9,0
• TBX2	1,5
Moléculas de adesão	7,5
• ICAM-1	40
• ICAM-1 e VCAM	20
• Integrinas	40
MMP	4,5
• MMP-2 e MMP-9	6,7
5-LOX	4,5
• LTB4	3,0
• FLAP	1,5
NF-κB	22,4
• IκB	40
• IKKα/β	20
• TLR4	3,0
• Myd88, TRIF, TRAM e IRF-3	1,5
• Ubiquitinação de TRAF6	1,5
• TNFAIP3	1,5
MAPK	11,9
• p38, ERK e JNK	50
• p38 e ERK	12,5
• p38	25
• ERK	12,5
Outros fatores de transcrição	
• Foxp3	3,0
• NFAT	1,5
• Nrf2	1,5

• Smad	1,5
• RORγT	1,5

Tabela 2 - Relação dos estudos incluídos na revisão sistemática sobre o efeito anti-inflamatório das cumarinas.

Parâmetro estudado	Referência
Toxicidade das cumarinas	(LIN et al., 2006; BUCOLO et al., 2008; PANDEY et al., 2010; YANG et al., 2011; SHARMA et al., 2012; WITAICENIS et al., 2012; XIONG et al., 2012; KIM et al., 2012; SANTOS et al., 2013; SHI et al., 2013; FU et al., 2013; KABEYA et al., 2013; KIM; KIM; LEE, 2013; LA et al., 2013; NIU et al., 2014, 2015a; SONG et al., 2014; TOGNA et al., 2014; TONG et al., 2014; YU et al., 2014a, 2014b; LIM et al., 2014; BANBURY et al., 2015; ROUGER et al., 2015; TSAI et al., 2015; LV et al., 2015)
Ensaio <i>in vitro</i>	(HAN et al., 2005; KUMAR et al., 2005; LIN et al., 2006; PANDEY et al., 2010; SHARMA et al., 2010, 2012; MEENA et al., 2011; UMAMAHESWARI et al., 2011; BHATNAGAR et al., 2012; ZHANG; LI; YANG, 2012; SANTOS et al., 2013; TANG et al., 2013; FU et al., 2013; KABEYA et al., 2013; LA et al., 2013; TOGNA et al., 2014; YU et al., 2014b; LEE et al., 2014; AZELMAT et al., 2015; BANBURY et al., 2015; LV et al., 2015; ROUGER et al., 2015; YANG et al., 2015; CHEN et al., 2015)
Ensaio <i>in vivo</i>	(GHATE; KUSANUR; KULKARNI, 2005; LUCHINI et al., 2008; PAN et al., 2009; TOYAMA et al., 2009; KHODE et al., 2009; KUROKAWA; IMAKITA; SHIRAKI, 2010; YAO et al., 2011; KALKHAMBKAR et al., 2011; LI et al., 2011; INGALE et al., 2012; AGGARWAL et al., 2013; ARAGADE; VENKATNARAYANAN; PATIL, 2013; OKUYAMA et al., 2013)
Ensaio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	(BUCOLO et al., 2008; BISSONNETTE et al., 2009; MELAGRAKI et al., 2009; CHOI; YAN, 2009; SYMEONIDIS et al., 2009; WITAICENIS; SEITO; STASI, 2010; YANG et al., 2011; NIU et al., 2012, 2014, 2015a; RIM et al., 2012; WITAICENIS et al., 2012, 2014; XIONG et al., 2012; KIM et al., 2012; LI et al., 2013; SHI et al., 2013; WANG et al., 2013;

	ELENKOV et al., 2013; HUA et al., 2013; KIM; KIM; LEE, 2013; LIM et al., 2014; SONG et al., 2014; TONG et al., 2014; YU et al., 2014a; GROVER et al., 2014; KEERTHY et al., 2014; SAHU et al., 2015; TSAI et al., 2015; DAWOOD et al., 2015)
Ensaio <i>in vivo</i> com camundongos	(BISSONNETTE et al., 2009; KUOKAWA; IMAKITA; SHIRAKI, 2010; YANG et al., 2011; RIM et al., 2012; XIONG et al., 2012; KIM et al., 2012; ELENKOV et al., 2013; OKUYAMA et al., 2013; SHI et al., 2013; WANG et al., 2013; HUA et al., 2013; KIM; KIM; LEE, 2013; LI et al., 2013; NIU et al., 2015a; SONG et al., 2014; TONG et al., 2014; YU et al., 2014a; KEERTHY et al., 2014; LIM et al., 2014; NIU et al., 2014)
Ensaio <i>in vivo</i> com ratos	(GHATE; KUSANUR; KULKARNI, 2005; LUCHINI et al., 2008; BUCOLO et al., 2008; MELAGRAKI et al., 2009; PAN et al., 2009; SYMEONIDIS et al., 2009; TOYAMA et al., 2009; CHOI; YAN, 2009; KHODE et al., 2009; WITAICENIS; SEITO; STASI, 2010; LI et al., 2011; YAO et al., 2011; KALKHAMBKAR et al., 2011; WITAICENIS et al., 2012, 2014; INGALE et al., 2012; AGGARWAL et al., 2013; ARAGADE; VENKATNARAYANAN; PATIL, 2013; GROVER et al., 2014; SAHU et al., 2015; TSAI et al., 2015; DAWOOD et al., 2015)
Ensaio <i>in vivo</i> com camundongos e ratos	(NIU et al., 2012)
Estudo <i>in vitro</i> células humanas	(HAN et al., 2005; KUMAR et al., 2005; BUCOLO et al., 2008; PANDEY et al., 2010; YANG et al., 2011; KIM et al., 2012; SANTOS et al., 2013; KABEYA et al., 2013; KIM; KIM; LEE, 2013; LA et al., 2013; LEE et al., 2014; KEERTHY et al., 2014; AZELMAT et al., 2015; ROUGER et al., 2015; TSAI et al., 2015; CHEN et al., 2015)
Estudo <i>in vitro</i> células animais	(LIN et al., 2006; BISSONNETTE et al., 2009; CHOI; YAN, 2009; SHARMA et al., 2010, 2012; WITAICENIS; SEITO; STASI, 2010; MEENA et al., 2011; BHATNAGAR et al.,

	2012; NIU et al., 2012, 2014, 2015a; RIM et al., 2012; XIONG et al., 2012; ZHANG; LI; YANG, 2012; SHI et al., 2013; TANG et al., 2013; WANG et al., 2013; ELENKOV et al., 2013; FU et al., 2013; HUA et al., 2013; LI et al., 2013; SONG et al., 2014; TOGNA et al., 2014; TONG et al., 2014; WITAICENIS et al., 2014; YU et al., 2014b; BANBURY et al., 2015; SAHU et al., 2015; YANG et al., 2015; LV et al., 2015)
Estudos <i>in vitro</i> células humanas e animais	(WITAICENIS et al., 2012; LIM et al., 2014; YU et al., 2014a)
Cumarinas e a inibição de células inflamatórias	(BISSONNETTE et al., 2009; PAN et al., 2009; LI et al., 2011; WITAICENIS et al., 2012; XIONG et al., 2012; KIM et al., 2012; HUA et al., 2013; WANG et al., 2013; KIM; KIM; LEE, 2013; SONG et al., 2014; YU et al., 2014a; KEERTHY et al., 2014; LIM et al., 2014; NIU et al., 2014, 2015b)
Cumarinas e a inibição da mieloperoxidase	(BUCCOLO et al., 2008; LUCHINI et al., 2008; WITAICENIS; SEITO; STASI, 2010; LI et al., 2011; WITAICENIS et al., 2012, 2014; KEERTHY et al., 2014; YU et al., 2014a; NIU et al., 2014, 2015b; TSAI et al., 2015)
Cumarinas e a inibição das moléculas de adesão	(KUMAR et al., 2005; BUCCOLO et al., 2008; PANDEY et al., 2010; YANG et al., 2011; ROUGER et al., 2015; TSAI et al., 2015)
Cumarinas e a inibição de edema	(GHATE; KUSANUR; KULKARNI, 2005; MELAGRAKI et al., 2009; PAN et al., 2009; SYMEONIDIS et al., 2009; TOYAMA et al., 2009; KHODE et al., 2009; LI et al., 2013; KALKHAMBKAR et al., 2011; LI et al., 2011; NIU et al., 2012, 2015b; WITAICENIS et al., 2012; INGALE et al., 2012; AGGARWAL et al., 2013; ARAGADE; VENKATNARAYANAN; PATIL, 2013; ELENKOV et al., 2013; SONG et al., 2014; TONG et al., 2014; GROVER et al., 2014; DAWOOD et al., 2015)
Cumarinas e a inibição do estresse oxidativo	(KUMAR et al., 2005; LIN et al., 2006; LUCHINI et al., 2008; MELAGRAKI et al., 2009; SYMEONIDIS et al., 2009; WITAICENIS; SEITO; STASI, 2010; UMAMAHESWARI et al., 2011; BHATNAGAR

	et al., 2012; WITAICENIS et al., 2012, 2014; HUA et al., 2013; KABEYA et al., 2013; LEE et al., 2014; CHEN et al., 2015; TSAI et al., 2015)
Cumarinas e a inibição do óxido nítrico	(LIN et al., 2006; MEENA et al., 2011; ZHANG et al., 2012b; RIM et al., 2012; FU et al., 2013; LI et al., 2013; TONG et al., 2014; YU et al., 2014b; LIM et al., 2014; TOGNA et al., 2014; BANBURY et al., 2015; YANG et al., 2015; LV et al., 2015; SAHU et al., 2015)
Cumarinas e a inibição da ciclooxigenase, lipoxigenase e seus produtos	(SYMEONIDIS et al., 2009; YANG et al., 2011; RIM et al., 2012; ELENKOV et al., 2013; FU et al., 2013; OKUYAMA et al., 2013; SANTOS et al., 2013; TONG et al., 2014; GROVER et al., 2014; TOGNA et al., 2014; DAWOOD et al., 2015; NIU et al., 2015b)
Cumarinas e a inibição de citocinas	(HAN et al., 2005; BISSONNETTE et al., 2009; PAN et al., 2009; CHOI; YAN, 2009; SHARMA et al., 2010, 2012; KUROKAWA; IMAKITA; SHIRAKI, 2010; LI et al., 2011, 2013; MEENA et al., 2011; YANG et al., 2011; YAO et al., 2011; NIU et al., 2012, 2014, 2015a; RIM et al., 2012; WITAICENIS et al., 2012; XIONG et al., 2012; KIM et al., 2012; LA et al., 2013; SANTOS et al., 2013; SHI et al., 2013; TANG et al., 2013; WANG et al., 2013; FU et al., 2013; HUA et al., 2013; KIM; KIM; LEE, 2013; LIM et al., 2014; SONG et al., 2014; TOGNA et al., 2014; TONG et al., 2014; YU et al., 2014a, 2014b; KEERTHY et al., 2014; BANBURY et al., 2015; SAHU et al., 2015)
Cumarinas e a inibição das metaloproteinases de matriz	(WITAICENIS et al., 2012; LA et al., 2013; SANTOS et al., 2013)
Cumarinas e a inibição de MAPK	(HAN et al., 2005; CHOI; YAN, 2009; NIU et al., 2012; RIM et al., 2012; HUA et al., 2013; YU et al., 2014a, 2014b; TSAI et al., 2015)
Cumarinas e a inibição de NF-κB	(CHOI; YAN, 2009; YANG et al., 2011; YAO et al., 2011; LI et al., 2011; RIM et al., 2012; WANG et al., 2013; HUA et al., 2013; YU et al., 2014a, 2014b; KEERTHY et al., 2014; NIU et al., 2014; SONG et al., 2014; TONG et al., 2014; AZELMAT et al., 2015; SAHU et al., 2015)

Cumarinas e Foxp3	(YAO et al., 2011; WANG et al., 2013)
Cumarinas e NFAT	(SONG et al., 2014)
Cumarinas e Nrf2	(HUA et al., 2013)
Cumarinas e Smad	(XIONG et al., 2012)
Cumarinas e ROR γ T	(YAO et al., 2011)

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliado o efeito do extrato bruto (EB), suas frações derivadas etanol (EtOH-F), hexano (HEX-F), acetato de etila (AcOEt-F) e diclorometano (DCM-F) e seus compostos isolados 5'-metoxi nobiletina (MeONOB), 1,2-benzopirona (BP) e eupalestina (EP) da *Ageratum conyzoides* L. sobre diferentes mediadores inflamatórios para investigar o efeito e o possível mecanismo de ação anti-inflamatório da planta, utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina λ , em camundongos. Paralelamente, foi realizada uma revisão sobre o efeito anti-inflamatório das cumarinas com dados pesquisados na literatura científica.

A escolha do tema da revisão foi baseada nos resultados dos estudos *in vivo*, nos quais foi observado o potencial anti-inflamatório dos compostos isolados da *A. conyzoides* L.. Dentre os compostos isolados, destacou-se a BP. A BP é uma cumarina simples, que foi capaz de inibir todos os parâmetros inflamatórios testados, além de ter sido o único composto isolado capaz de promover o aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. Assim, objetivando aprofundar o entendimento sobre o efeito anti-inflamatório das cumarinas, foi realizada esta revisão da literatura.

Como mencionado anteriormente, mesmo que a pleurisia seja um modelo experimental com características comuns a diferentes doenças inflamatórias e de não mimetizar nenhuma doença humana específica, é um modelo de inflamação aguda que apresenta vantagens, dentre elas, ser um modelo adequado para triagem de novos fármacos e substâncias com potencial atividade anti-inflamatória (SEDGWICK; LEES, 1986). Em nosso laboratório (Laboratório de Pesquisa em Imunologia – LAPI/UFSC), o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos foi padronizado pela Prof.^a Dra. Tânia Silvia Fröde, e vem sendo utilizado por alunos de iniciação científica, mestrandos e doutorando na pesquisa do efeito anti-inflamatório de fármacos e plantas ao longo dos últimos 15 anos (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; DALMARCO; FRÖDE; MEDEIROS, 2002; DA SILVA; FARGES; FRÖDE, 2004; GOULART et al., 2007; VARGAS et al., 2007; FRÖDE et al.,

2009; DA SILVA BUSS; MEDEIROS; FRÖDE, 2012; DOS REIS et al., 2014; VIGIL DE MELLO et al., 2016).

Inicialmente, os resultados obtidos com o extrato bruto, frações e compostos isolados da *A. conyzoides* L. mostraram que a planta apresentou efeito anti-inflamatório, uma vez que houve inibição dos parâmetros inflamatórios como migração leucocitária e as concentrações de enzimas envolvidas no processo inflamatório (MPO e ADA). Corroborando com os resultados obtidos neste estudo, Corrêa e colaboradores (2015), também utilizando o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, demonstraram que a *A. conyzoides* L. se mostrou efetiva em inibir a infiltração de células inflamatórias no lavado pleural.

No presente estudo, a redução da migração leucocitária, ocorreu principalmente à custa de neutrófilos. A inibição da quimiotaxia de neutrófilos se deve, entre outros fatores, a redução de fatores quimiotáticos. Neste contexto, a redução da concentração da MPO parece ter contribuído para redução do número de neutrófilos no lavado pleural. Isso porque a MPO parece estar relacionada também à quimiotaxia de neutrófilos (HAEGENS et al., 2009). Paralelamente, a enzima MPO é conhecida por ser um importante marcador de neutrófilos ativados (FRÖDE; MEDEIROS, 2001). Sendo assim, estes resultados são um forte indicativo de que, além de inibir a migração celular, a planta também reduz a ativação de neutrófilos no local da inflamação. Os resultados obtidos corroboram com dados da literatura, como o estudo desenvolvido por Biradar e colaboradores (2011), que constatou que o tratamento com *A. conyzoides* L. inibiu a atividade da MPO no modelo de enterocolite induzida por indometacina, em ratos (BIRADAR et al., 2011).

Por outro lado, a mesma observação pode ser aplicada para as cumarinas, que, de acordo com a literatura, apresentaram o mesmo efeito sobre neutrófilos e MPO. Ainda, as cumarinas inibiram as moléculas de adesão envolvidas no recrutamento de leucócitos e na interação entre o leucócito e a célula endotelial (ICAM-1, VCAM-1 e integrinas), o que certamente contribuiu para o efeito descrito sobre a migração leucocitária (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; DENYS et al., 2016). Destaca-se ainda que estes compostos estimularam a

diferenciação de células Treg no baço. Uma vez que as células Treg são essenciais na manutenção da tolerância periférica a antígenos próprios, suprimindo respostas anormais ou exageradas envolvidas nas doenças autoimunes e doenças inflamatórias crônicas (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008; ROSENBLUM; WAY; ABBAS, 2015).

Também foi observado no presente estudo que a atividade anti-inflamatória da *A. conyzoides* L. foi associada a diminuição da adenosina desaminase (ADA). Os resultados mostraram que o extrato bruto, as frações e os compostos isolados da *A. conyzoides* L. foram eficazes em reduzir a concentração da ADA, o que reforça a hipótese de que a planta estudada seja capaz de inibir a ativação de células inflamatórias (mononucleares e neutrófilos) no local da inflamação.

Em relação à migração leucocitária e às concentrações de MPO e ADA, ao comparar as frações da *A. conyzoides* L., observou-se que a fração etanol apresentou o melhor efeito anti-inflamatório entre as frações testadas, uma vez que esta fração promoveu inibição destes parâmetros na dose de 10 mg/kg, o que só ocorreu com as demais frações em doses superiores (50 mg/kg).

Ao mesmo tempo, de todo o material testado, os compostos isolados MeONOB, BP e EP exibiram o efeito mais expressivo, uma vez que reduziram a migração leucocitária, bem como as concentrações de MPO e ADA na dose de 5 mg/kg cada.

Outro fator que pode ter contribuído para redução da migração leucocitária foi a inibição do NOx, no lavado pleural dos animais tratados com extrato bruto, frações e compostos isolados da *A. conyzoides* L.. Isso porque, sabe-se que o NO é um importante mediador pró-inflamatório liberado durante a resposta inflamatória aguda e crônica e está relacionado com o quimiotaxia celular (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; SANTOS et al., 2012). O estudo desenvolvido por Chaves e colaboradores (2011) demonstrou que a liberação de NO está diretamente relacionada ao aumento do influxo de neutrófilos, no modelo de artrite induzida por zymozan, em ratos.

Os resultados obtidos vão de encontro aos dados da literatura, como o estudo conduzido por Corrêa e colaboradores (2015), que demonstraram que a *A. conyzoides* L. se mostrou

efetiva em inibir a concentração de NO_x, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

Ao traçar um paralelo com os dados publicados entre 2005 e 2015 sobre o efeito anti-inflamatório das cumarinas, observa-se que estes compostos apresentaram perfil semelhante ao da *A. conyzoides* L., uma vez que foram capazes de inibir a formação de edema e reduzir a concentração de NO_x. Ainda, de acordo com a literatura pesquisada, as cumarinas inibiram a enzima NOS2. Assim, provavelmente, o efeito inibitório das cumarinas sobre a formação de edema está relacionado ao seu efeito inibitório sobre NO, que é um potente vasodilatador, e também sobre NOS2 (LIN et al., 2006; MEENA et al., 2011; ZHANG et al., 2012b; RIM et al., 2012; FU et al., 2013; LI et al., 2013; TONG et al., 2014; YU et al., 2014b; LIM et al., 2014; TOGNA et al., 2014; BANBURY et al., 2015; YANG et al., 2015; LV et al., 2015; SAHU et al., 2015).

No presente estudo, a fração etanol mostrou novamente ser a mais potente das frações, pois foi efetiva em reduzir a concentração das proteínas do exsudato e de NO_x na dose de 10 mg/kg. As demais frações promoveram o mesmo efeito com dose 5 vezes maior (50 mg/kg). Assim como observado anteriormente, os três compostos isolados se destacaram por inibirem o mesmo parâmetro com metade da dose da fração etanol (5 mg/kg).

O extrato bruto, frações e compostos isolados da *A. conyzoides* L. também inibiram a concentração de proteínas no exsudato. Está reportado na literatura que a formação de exsudato durante o processo inflamatório é resultado do aumento da permeabilidade vascular, acúmulo de líquido e extravasamento de proteínas plasmáticas (KOTTKE; WALTERS, 2016). Assim, a diminuição da concentração de proteínas no lavado pleural é um indicativo que provavelmente a planta promoveu a redução da permeabilidade vascular e conseqüentemente inibição da formação de edema. Os resultados encontrados em nosso estudo corroboram com os resultados encontrados por Rahman e colaboradores (2012) (2012) e Corrêa e colaboradores (2015) que observaram que a *A. conyzoides* L. demonstrou efeito anti-inflamatório ao reduzir o edema induzido pela carragenina no modelo de edema de pata, em camundongos.

Concluída a fase inicial dos experimentos, observou-se que, dentre as quatro frações testada, a fração etanol foi a mais potente em relação aos parâmetros testados até então. Desta forma, a fração etanol foi a fração escolhida para a realização dos experimentos subseqüentes, juntamente com o extrato bruto e os três compostos isolados.

Dando continuidade ao projeto experimental, a etapa seguinte teve como propósito avaliar o efeito do extrato bruto, fração etanol e compostos isolados sobre a concentração de citocinas IL-17A, IL-6, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 e IL-10.

As citocinas pró-inflamatórias IL-17A, IL-6, TNF- α , IFN- γ e MCP-1 são liberadas principalmente por neutrófilos ativados e estão associadas ao desenvolvimento e a amplificação da resposta inflamatória e da resposta imune inata (AMULIC et al., 2012), como ocorre no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Neste estudo experimental, o extrato bruto, a fração etanol e os compostos isolados mostraram-se efetivos em reduzir as concentrações das citocinas IL-17A, IL-6, TNF- α e IFN- γ no lavado da cavidade pleural. Além disso, o extrato bruto, a fração etanol e os compostos isolados MeONOB e BP, mas não a EP, também promoveram a redução das concentrações de MCP-1. Esses resultados reforçam novamente a hipótese de que a *A. conyzoides* L. seja capaz de inibir a ativação de neutrófilos e mononucleares, não só pela observação da redução das concentrações da MPO e ADA, mas também pela diminuição das concentrações de citocinas secretadas por essas células. Os resultados apresentados neste estudo corroboram com a pesquisa realizada por Salim e colaboradores (2014), que observou que o extrato bruto da *A. conyzoides* L. se mostrou efetivo em inibir a liberação de citocinas (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) por monócitos do sangue periférico humano, em estudos *in vitro* (SALIM; KUMLOSASI; JANTAN, 2014).

Paralelamente, nas mesmas condições experimentais, o extrato bruto, a fração etanol e o composto isolado BP ainda promoveram o aumento da concentração da citocina IL-10 no lavado da cavidade pleural. De forma geral, a IL-10 é considerada um importante mediador anti-inflamatório, capaz de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-

6, IL-8 e IL-12) por monócitos e macrófagos (AHMAD et al., 2014).

Novamente, destaca-se que os compostos isolados, principalmente a MeONOB e a BP, apresentaram o efeito mais expressivo, inibindo os parâmetros testados em dose inferior à dose utilizada para o extrato bruto (50 mg/kg) e para fração etanol (10 mg/kg).

Ao analisar a literatura selecionada para o estudo do efeito anti-inflamatório das cumarinas, observou-se que esta classe de compostos, assim como a *A. conyzoides* L., foi capaz inibir a secreção de diversas citocinas e quimiocinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , MCP-1 e IL-17, além de promover o aumento de IL-10. Além disso, as cumarinas ainda inibiram as MMP. As MMP, ao degradarem os componentes da matriz extracelular (MEC), promovem a liberação de fatores de crescimento latentes, citocinas e quimiocina presentes na MEC (CHOU; CHAN; WERB, 2016). Assim, o efeito inibitório sobre as MMP pode contribuir, em parte, para o efeito inibitório das cumarinas sobre as citocinas e quimiocinas.

Finalizada a avaliação do efeito do extrato bruto, fração etanol e compostos isolados da *A. conyzoides* L. sobre a concentração de citocinas, e observado o desempenho dos compostos isolados, a próxima etapa deste estudo foi verificar o efeito dos compostos isolados MeONOB, BP e EP sobre o NF- κ B e vias de sinalização de proteínas cinases. Esta etapa do projeto experimental teve como objetivo a elucidação de um possível mecanismo de ação anti-inflamatório que justificasse os resultados obtidos até então, permitindo avaliar se os efeitos da planta se limitavam a um efeito pós-transcricional ou se envolvia também um efeito pré-transcricional.

Para tanto, foi avaliado o efeito dos compostos isolados sobre a fosforilação da subunidade p65 de NF- κ B, sobre a proteína p38 MAPK total e fosforilada e a proteína ERK fosforilada.

Conforme literatura vigente, o NF- κ B, a p38 MAPK e a ERK são vias cuja ativação resulta na expressão gênica de diversos mediadores da inflamação, dentre eles NOS2, COX-2, PGE₂, citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α), quimiocinas (MCP-1) e moléculas de adesão (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1) (CARTER; MONICK; HUNNINGHAKE, 1999; KUROSAWA et al.,

2000; ZARUBIN; HAN, 2005; BATRA; BALAMAYOORAN; SAHOO, 2011; LEYVA-ILLADES et al., 2012; YANG et al., 2014; PASTUHOV; HISAMOTO; MATSUMOTO, 2015; YOKOTA; WANG, 2016).

Assim, nas mesmas condições experimentais utilizadas para os experimentos anteriores, os compostos isolados se mostraram efetivos em inibir a fosforilação da subunidade p65 de NF- κ B e p-p38 MAPK. Em vista dos resultados obtidos, sugere-se que a *A. conyzoides* L., além de inibir a ativação de células inflamatórias (neutrófilos e mononucleares), reduzindo a liberação de mediadores da inflamação, também iniba a expressão gênica desses mediadores, uma vez que seus compostos isolados são capazes de inibir a ativação das vias de sinalização do NF- κ B e MAPK.

Corroborando com resultados obtidos, Yoshigai e colaboradores (2013) observaram que a nobiletina extraída da casca de frutas cítricas inibiu a produção de NO, via inibição da expressão de NOS2, em cultura de hepatócitos de ratos. Neste estudo, os pesquisadores constataram que a nobiletina foi capaz de inibir a expressão NOS2 em nível pré e pós-transcricional, uma vez que o composto inibiu a ativação de NF- κ B (YOSHIGAI et al., 2013).

Novamente, ao analisar os dados publicados sobre o efeito anti-inflamatório das cumarinas, observou-se que existe um perfil semelhante ao encontrado para *A. conyzoides* L., uma vez que as cumarinas foram efetivas em inibir diferentes fatores de transcrição e mediadores envolvidos na cascata de ativação das vias de sinalização.

Em relação às vias das MAPK, de acordo com os dados da literatura, as cumarinas inibiram a fosforilação de p38 MAPK, ERK e JNK (CHOI; YAN, 2009; YU et al., 2014a, 2014b). Em relação à via do NF- κ B, os estudos publicados mostraram que as cumarinas não só inibiram a fosforilação de NF- κ B, mas também da proteína inibitória I κ B α e de IKK α / β , prejudicando a ativação desta via de sinalização (RIM et al., 2012; YU et al., 2014a, 2014b). Paralelamente, alguns estudos mostraram que as cumarinas são capazes de reduzir a ativação da via do NF- κ B também por inibir moléculas que participam da cascata de sinalização, como o TLR4, Myd88, TRIF, TRAM e IRF-3 e por inibir a ubiquitinação de TRAF6 (WANG et al., 2013; NIU et al.,

2014). Adicionalmente, as cumarinas ainda aumentaram a concentração de TNFAIP3, que atua regulando negativamente a ativação da via do NF- κ B (YU et al., 2014a).

Paralelamente, os dados da literatura mostraram que as cumarinas exibiram um importante efeito antioxidante (KUMAR et al., 2005; LUCHINI et al., 2008; SYMEONIDIS et al., 2009; UMAMAHESWARI et al., 2011; BHATNAGAR et al., 2012; HUA et al., 2013; KABEYA et al., 2013; WITAICENIS et al., 2014; LEE et al., 2014; CHEN et al., 2015; TSAI et al., 2015). Assim, uma vez que estes compostos são capazes de inibir o estresse oxidativo, o mesmo fica impedido de ativar fatores de transcrição, como o NF- κ B.

Por outro lado, de acordo com a literatura pesquisada, o efeito das cumarinas não se limita a ação inibitória sobre as vias de sinalização das MAPK e NF- κ B. Os estudos pesquisados mostraram que estes compostos também aumentaram a expressão e a concentração de Foxp3, o que pode estar relacionado ao aumento da diferenciação de Treg observado na literatura, de Nrf2 e Smad7, cuja ativação está relacionada a um efeito anti-inflamatório (YAO et al., 2011; XIONG et al., 2012; HUA et al., 2013; WANG et al., 2013).

Ainda, de acordo com os dados pesquisados, as cumarinas reduziram a concentração de NFAT, Smad2/3 e ROR γ T, o que certamente contribui para inibição da expressão de genes relacionados à produção de citocinas pró-inflamatórias, observada na revisão da literatura (YAO et al., 2011; XIONG et al., 2012; SONG et al., 2014).

Sumarizando, o efeito inibitório das cumarinas sobre as vias de sinalização das MAPK, NF- κ B, NFAT, Smad e ROR γ T pode estar associado ao efeito destes compostos sobre outros mediadores, como citocinas, NOx, NOS2, COX-2, PGE₂, entre outros.

Apesar de que os estudos incluídos na revisão sistemática evidenciem o importante efeito anti-inflamatório das cumarinas e afirmarem em seus experimentos que a toxicidade dos compostos testados não era relevante, vale destacar que estes compostos possuem efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos comprovados e seu uso prolongado e indiscriminado pode oferecer risco à saúde dos pacientes (HAZLETON et al., 1956; ABRAHAM et al., 2010).

Durante realização do estudo experimental, o efeito do extrato bruto, frações e compostos isolados *A. conyzoides* L. foi comparado ao efeito anti-inflamatório da dexametasona, o fármaco de referência. De acordo com os resultados obtidos, o extrato bruto, as frações e os três compostos isolados demonstram efeito anti-inflamatório similar ao da dexametasona em relação à migração leucocitária, concentração das enzimas MPO e ADA, concentração das proteínas do exsudato e concentração de NOx. O mesmo foi observado ao comparar o efeito do extrato bruto, fração etanol e compostos isolados sobre a concentração de citocinas. Por fim, ao comparar o efeito dos compostos isolados e da dexametasona sobre a fosforilação de p65 NF- κ B, p38 MAPK total e fosforilada e ERK, observou-se um perfil muito similar. Apesar de o efeito anti-inflamatório ser semelhante ao da dexametasona, nem mesmo os compostos isolados se mostraram tão potentes quanto o fármaco de referência, uma vez que foi necessária uma dose dez vezes maior para se obter o mesmo efeito. Por outro lado, a dexametasona é um anti-inflamatório esteroide, cujo uso prolongado exibe elevada toxicidade e severos efeitos adversos, como a síndrome de Cushing, dislipidemias, osteoporose e diabetes tipo 2.

7. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos com os estudos da *Ageratum conyzoides* L., no modelo da pleurisia em camundongos, e nos dados obtidos na literatura sobre as cumarinas, pode-se concluir que:

- a) A *A. conyzoides* L. demonstrou importante efeito anti-inflamatório inibindo o influxo de leucócitos e a concentração de proteínas do exsudato. Este efeito parece ser em parte mediado pela redução das concentrações de enzimas (MPO e ADA), bem como de mediadores pró-inflamatórios (NOx, IL-17A, IL-6, TNF- α , IFN- γ e MCP-1), além do aumento de uma citocina anti-inflamatória (IL-10). Provavelmente, o mecanismo de ação anti-inflamatório da *A. conyzoides* L. envolve a inibição da via de NF- κ B e MAPK, uma vez que se observou que os compostos isolados da planta foram

efetivos em inibir a fosforilação de p65 NF- κ B e de p-p38 MAPK.

- b) As cumarinas são produtos naturais com importante efeito anti-inflamatório e antioxidante, inibindo leucócitos, edema, enzimas e mediadores da resposta inflamatória e este efeito parecer estar relacionado à inibição da ativação de MAPK e NF- κ B, e o aumento da concentração de TNFAIP3, Foxp3, Nrf2 e Smad7.
- c) Com base nestes resultados pré-clínicos, os compostos isolados MeONOB, BP e EP, bem como as cumarinas podem ser considerados importantes candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios.

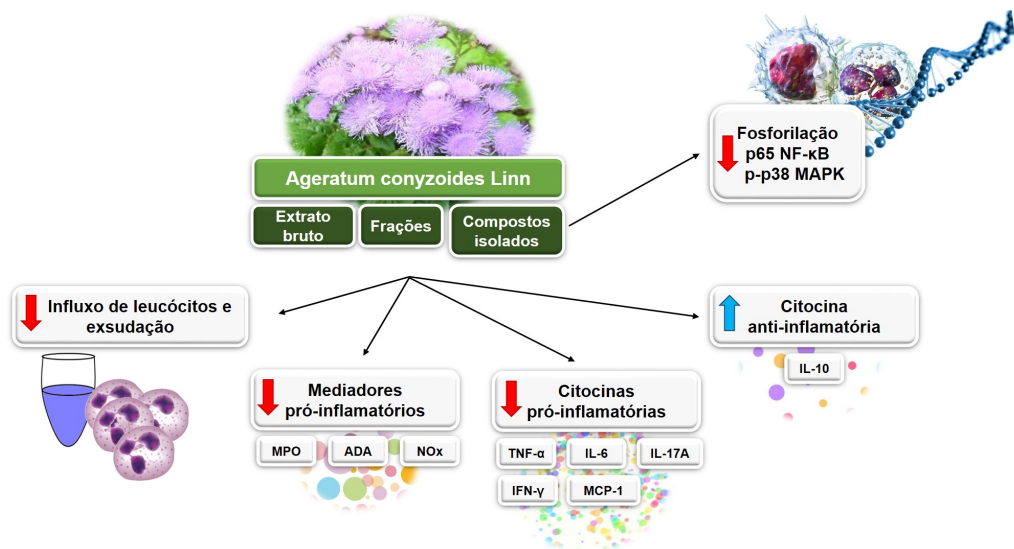


Figura 22 - Proposta de mecanismo de ação anti-inflamatória da *A. conyzoides* L., no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. ADA: adenosina-desaminase; IFN-γ: interferon gama; IL: interleucina; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1; MPO: mieloperoxidase; NOx: metabólitos do óxido nítrico; p38 MAPK: cinase ativada por mitógeno p38; p65: subunidade do fator nuclear kappa B (NF-κB); TNF-α: fator de necrose tumoral alfa.

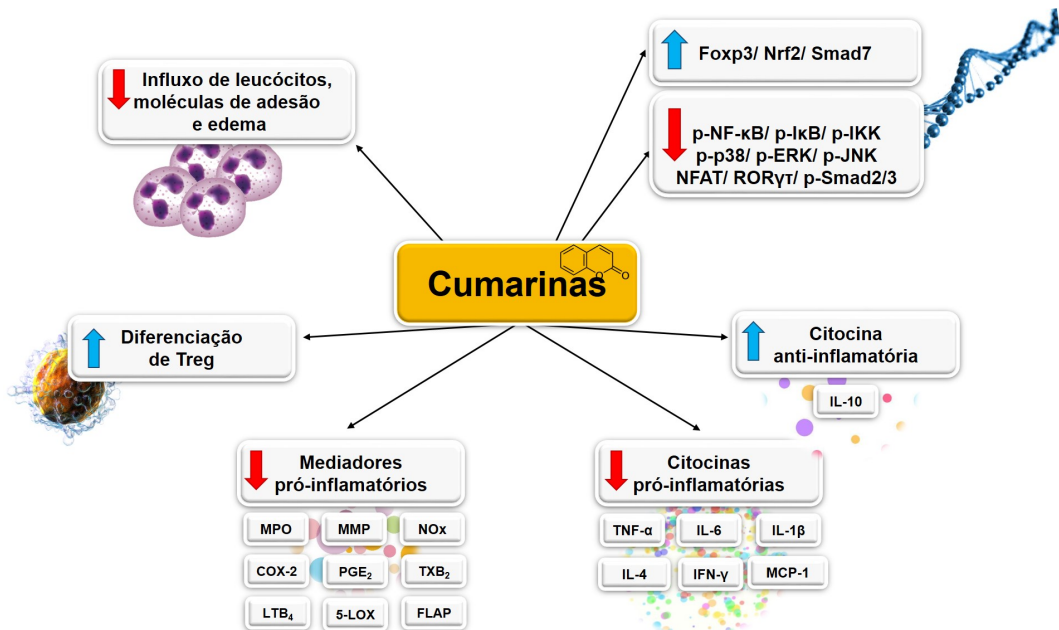


Figura 23 - Proposta de mecanismo de ação anti-inflamatória das cumarinas. 5-LOX: 5-lipoxigenase; COX-2: cicloxigenase 2; ERK: cinases reguladas por sinal extracelular; FLAP: proteína ativadora de 5-LOX; Foxp3: Forkhead box P3; IFN- γ : interferon gama; IL: interleucina; JNK: cinases c-Jun N-terminal; LTB₄: leucotrieno B₄; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1; MMP: metaloproteínas de matriz, MPO: mieloperoxidase; NFAT: fator nuclear de células T ativadas; NF- κ B: fator nuclear kappa B; NOx: metabólitos do óxido nítrico; Nrf2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2; p38 MAPK: cinase ativada por mitógeno p38; PGE₂: prostaglandina E₂; ROR γ T: fator de transcrição órfão gama relacionado ao ácido retinoico; Smad: proteínas intracelulares que atuam como fatores de transcrição; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; Treg: linfócitos T regulatórios; TXB₂: tromboxano B₂.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, K.; WO, F.; LINDTNER, O.; HEINEMEYER, G. Toxicology and risk assessment of coumarin: focus on human data. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 228–239, 2010.
- ADEBAYO, A. H.; TAN, N. H.; AKINDAHUNSI, A. A.; ZENG, G. Z.; ZHANG, Y. M. Anticancer and antiradical scavenging activity of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 21, p. 62–66, 2010a.
- ADEBAYO, A. H.; ZENG, G. Z.; ZHANG, Y. M.; JI, C. J.; AKINDAHUNSI, A.; TAN, N. H. Toxicological evaluation of precocene II isolated from *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) in Sprague Dawley rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 20, p. 2938–2944, 2010b.
- ADETUTU, A.; MORGAN, W. A.; CORCORAN, O.; CHIMEZIE, F. Antibacterial activity and in vitro cytotoxicity of extracts and fractions of *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. stem bark and *Ageratum conyzoides* Linn. leaves. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 478–483, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2012.06.008>>.
- AGGARWAL, R.; KUMAR, S.; KAUSHIK, P.; KAUSHIK, D.; GUPTA, G. K. Synthesis and pharmacological evaluation of some novel 2-(5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydropyrazol-1-yl)-4-(coumarin-3-yl)thiazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 508–514, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.11.046>>.
- AGRA, M. de F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F. de; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472–508, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000300023&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.
- AHMAD, S. F.; ZOHEIR, K. M. A.; ABDEL-HAMIED, H. E.; ATTIA, S. M.; BAKHEET, S. A.; ASHOUR, A. E.; ABD-ALLAH, A. R. A. Grape seed proanthocyanidin extract protects against carrageenan-induced lung inflammation in mice through reduction of pro-inflammatory markers and chemokine expressions. **Inflammation**, v. 37, n. 2, p. 500–511, 2014.

AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 459–489, 2012.

Disponível em:

<<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>>.

ANTONIOLI, L.; CSÓKA, B.; FORNAI, M.; COLUCCI, R.; KÓKAI, E.; BLANDIZZI, C.; HASKÓ, G. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 8, p. 1051–1068, 2014.

ANVARI, F.; SHARMA, A. K.; FERNANDEZ, L. G.; HRANJEC, T.; RAVID, K.; KRON, I. L.; LAUBACH, V. E. Tissue-derived proinflammatory effect of adenosine A2B receptor in lung ischemia-reperfusion injury. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 140, n. 4, p. 871–877, 2010. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2010.06.051>>.

ARAGADE, P.; VENKATNARAYANAN, R.; PATIL, P. Synthesis and biological evaluation of a novel series of pyrazolylcoumarins as anti-inflammatory and antioxidant agents. **Drug Reseresh**, v. 63, p. 28–33, 2013.

ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, n. 1, p. 92–106, 2010. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.008>>.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, n. 1, p. 385–406, 2012. Disponível em:

<<http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530>>
<<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530>>.

ASTUTI, R. I.; NASUNO, R.; TAKAGI, H. Nitric oxide signaling in yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1–15, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7827-7>>.

AYROLDI, E.; CANNARILE, L.; MIGLIORATI, G.; NOCENTINI, G.;

DELFINO, D. V.; RICCARDI, C. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. **FASEB Journal**, v. 26, n. 12, p. 4805–4820, 2012.

AZELMAT, J.; FIORITO, S.; ALESSANDRO, V.; GENOVESE, S.; EPIFANO, F.; GRENIER, D. Synthesis and evaluation of antibacterial and anti-inflammatory properties of naturally occurring coumarins. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 399–405, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2015.08.008>>.

BADKE, M. R.; LOURDES, M. De; BUDÓ, D.; APARECIDA, N.; ALVIM, T.; DOLEJAL, G. Popular knowledge and practices regarding healthcare using medicinal plants. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 363–370, 2012.

BAI, Y.; LI, D.; ZHOU, T.; QIN, N.; LI, Z.; YU, Z.; HUA, H. Coumarins from the roots of *Angelica dahurica* with antioxidant and antiproliferative activities. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 453–462, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.018>>.

BANBURY, L. K.; SHOU, Q.; RENSHAW, D. E.; LAMBLEY, E. H.; GRIESSER, H. J.; MON, H.; WOHLMUTH, H. Compounds from *Geijera parviflora* with prostaglandin E₂ inhibitory activity may explain its traditional use for pain relief. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 163, p. 251–255, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.01.033>>.

BARNES, P. J. Inhaled corticosteroids. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 3, p. 514–540, 2010.

BATRA, S.; BALAMAYOORAN, G.; SAHOO, M. K. Nuclear factor- κ B: a key regulator in health and disease of lungs. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 59, n. 5, p. 335–351, 2011.

BEYAZIT, Y.; KOKLU, S.; TAS, A.; PURNAK, T.; SAYILIR, A.; KURT, M.; TURHAN, T.; CELIK, T.; SUVAK, B.; TORUN, S.; AKBAL, E. Serum adenosine deaminase activity as a predictor of disease severity in ulcerative colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 6, n. 1, p. 102–107, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2011.07.010>>.

BHATNAGAR, A.; SHARMA, P. K.; KUMAR, N.; UPADHYAY, A.

Synthesis and in vitro evaluation of antioxidante and anti-inflammatory activity of 3-[4 , 5-dihydro-(5-substituted phenyl)-1 H-pyrazol-3-yl] -2 H-chromen-2-onde derivatives. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 46, n. 8, p. 482–487, 2012.

BHATTACHARYYA, S.; DUDEJA, P. K.; TOBACMAN, J. K. Carrageenan-induced NF- κ B activation depends on distinct pathways mediated bt reactive oxygen species and hsp27 or by bcl10. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 0, p. 973–982, 2008.

BHATTACHARYYA, S.; GILL, R.; CHEN, M. L.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J.; DUDEJA, P. K.; TOBACMAN, J. K. Toll-like Receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NF κ B-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 16, p. 10550–10558, 2008.

BIRADAR, S. M.; ASWATHANARAYANA, B. J.; KULKARNI, V. H.; KULKARNI, P. V.; SMITA, D. M.; TARAK, K. C. Protective effects of ethanolic extract of *Ageratum conyzoides* on experimental induced inflammatory bowel disease. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 6, n. 8, p. 664–678, 2011.

BISSONNETTE, E. Y.; TREMBLAY, G. M.; TURMEL, V.; PIROTTE, B.; REBOUD-RAVAUX, M. Coumarinic derivatives show anti-inflammatory effects on alveolar macrophages, but their anti-elastase activity is essential to reduce lung inflammation in vivo. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 49–54, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2008.09.009>>.

BISWAS, I.; SINGH, B.; SHARMA, M.; AGRAWALA, P. K.; KHAN, G. A. Extracellular RNA facilitates hypoxia-induced leukocyte adhesion and infiltration in the lung through TLR3-IFN- γ -STAT1 signaling pathway. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 11, p. 3158–3173, 2015.

BOSE, S.; CHO, J. Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 9, p. 1039–1050, 2013.

BOSI, C. F.; ROSA, D. W.; GROUGNET, R.; LEMONAKIS, N.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, A. L.; BIAVATTI, M. W. Pyrrolizidine alkaloids in medicinal tea of *Ageratum conyzoides*.

Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 23, n. 3, p. 425–432, 2013.

BRYANT, V. L.; SLADE, C. A. Chemokines, their receptors and human disease: the good, the bad and the itchy. **Immunology and Cell Biology**, v. 93, p. 364–371, 2015.

BUCOLO, C.; MALTESE, A.; MAUGERI, F.; WARD, K. W.; SPAMPINATO, S.; BAIULA, M.; SPARTA, A. New coumarin-based anti-inflammatory drug: putative antagonist of the integrins $\alpha\text{L}\beta 2$ and $\alpha\text{M}\beta 2$. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 1473–1479, 2008.

CAORSI, R.; PENCO, F.; SCHENA, F.; GATTORNO, M. Monogenic polyarteritis: the lesson of ADA2 deficiency. **Pediatric Rheumatology**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12969-016-0111-7>>.

CAPASSO, F.; DUNN, C. J.; YAMAMOTO, S.; DEPORTER, D. A.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Pharmacological mediators of various immunological and non-immunological inflammatory reactions produced in the pleural cavity. **Agents and Actions**, v. 5, n. 5, p. 528–533, 1975.

CARTER, A. B.; MONICK, M. M.; HUNNINGHAKE, G. W. Both ERK and p38 kinases are necessary for cytokine gene transcription. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 20, n. 4, p. 751–758, 1999.

CHABAUD, M.; DURAND, J. M.; BUCHS, N.; FOSSIEZ, F.; PAGE, G.; FRAPPART, L.; MIOSSEC, P. Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. **Arthritis and Rheumatism**, v. 42, n. 5, p. 963–970, 1999.

CHAVES, H. V.; RIBEIRO, R. D. A.; DE SOUZA, A. M. B.; SILVA, A. A. R. E.; GOMES, A. S.; VALE, M. L.; BEZERRA, M. M.; BRITO, G. A. D. C. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1–11, 2011.

CHEN, J.; YANG, C.; KUO, Y.; HWANG, T. New coumarin derivatives and other constituents from the Stem Bark of *Zanthoxylum avicennae*: effects on neutrophil pro-inflammatory responses. **International journal of molecular sciences**, v. 16, p. 9719–9731, 2015.

CHOI, Y. H.; YAN, G. H. Anti-allergic effects of scoparone on mast cell-mediated allergy model. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1089–1094, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.003>>.

CHOU, J.; CHAN, M. F.; WERB, Z. Metalloproteinases : a functional pathway for myeloid cells. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 1–15, 2016.

CHUNG, V. C. H.; MA, P. H. X.; LAU, C. H.; WONG, S. Y. S.; YEOH, E. K.; GRIFFITHS, S. M. Views on traditional Chinese medicine amongst Chinese population: a systematic review of qualitative and quantitative studies. **Health Expectations**, v. 17, n. 5, p. 622–636, 2014.

CIEPIELA, O.; OSTAFIN, M.; DEMKOW, U. Neutrophils in asthma - a review. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 209, p. 13–16, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2014.12.004>>.

COMMINS, S. P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, p. S53–S72, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.008>>.

CORRÊA, A. F.; GRASSI, L. T.; MEYRE-SILVA, C.; MORA, T. C.; BARROS, D. M.; DALMARCO, E. M.; SOUZA, M. De. Evaluation of anti-inflammatory potential of *Ageratum conyzoides* (AC) extracts in vivo and in vitro models: confirmation of popular use. **International Journal of Phytopharmacy Research**, v. 6, n. 2, p. 69–77, 2015.

CORTÉS, A.; GRACIA, E.; MORENO, E.; MALLOL, J.; LLUÍS, C.; CANELA, E. I.; CASADÓ, V. Moonlighting adenosine deaminase: a target protein for drug development. **Medicinal Research Reviews**, v. 35, n. 1, p. 85–125, 2015.

COUTINHO, A. E.; CHAPMAN, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 1, p. 2–13, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.005>>.

DA SILVA, M. B. S.; FARGES, R. C.; FRÖDE, T. S. Involvement of steroids in anti-inflammatory effects of PK11195 in a murine model of

pleurisy. **Mediators of inflammation**, v. 13, n. 2, p. 93–103, 2004.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1781550&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DA SILVA BUSS, Z.; MEDEIROS, Y. S.; FRÖDE, T. S. PPAR-gamma agonist rosiglitazone attenuates the inflammation caused by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 280–288, 2012.

DABBOUS, O. A.; SOLIMAN, M. M.; MOHAMED, N. H.; ELSEIFY, M. Y.; ELSHEIKH, M. S.; ALSHARKAWY, A. A. A.; ABD AL AZIZ, M. M. Evaluation of the improvement effect of laser acupuncture biostimulation in asthmatic children by exhaled inflammatory biomarker level of nitric oxide. **Lasers in Medical Science**, p. 1–7, 2016. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27709308>>.

DALMARCO, E. M.; FRÖDE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 5, p. 299–306, 2002. Disponível em:

<<http://www.hindawi.com/journals/mi/2002/769039/abs/>>.

DAS, A.; SINHA, M.; DATTA, S.; ABAS, M.; CHAFFEE, S.; SEN, C. K.; ROY, S. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 10, p. 2596–2606, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.06.001>>.

DAWOOD, D. H.; BATRAN, R. Z.; FARGHALY, T. A.; KHEDR, M. A.; ABDULLA, M. M. New coumarin derivatives as potent selective COX-2 inhibitors: synthesis, anti-inflammatory, QSAR, and molecular modeling studies. **Archiv der Pharmazie**, v. 348, p. 875–888, 2015.

DE VRIES, M. A.; ALIPOUR, A.; BIRNIE, E.; WESTZAAN, A.; VAN SANTEN, S.; VAN DER ZWAN, E.; LIEM, A. H.; VAN DER MEULEN, N.; CABEZAS, M. C. Coronary leukocyte activation in relation to progression of coronary artery disease. **Frontiers of Medicine**, v. 10, n. 1, p. 85–90, 2016.

DENYS, A.; CLAVEL, G.; LEMEITER, D.; SCHISCHMANOFF, O.; BOISSIER, M.-C.; SEMERANO, L. Aortic VCAM-1: an early marker of vascular inflammation in collagen-induced arthritis. **Journal of**

Cellular and Molecular Medicine, v. 20, n. 5, p. 855–863, 2016.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jcmm.12790>>.

DESHMANE, S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–326, 2009.

Disponível em:

<<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jir.2008.0027>>.

DHALENDRA, G.; SATAPATHY, T.; ROY, A. Animal models for inflammation: a review. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 207–212, 2013.

DIALLO, A.; EKLU-GADEGKEKU, K.; AKLIKOKOU, K.; CREPPY, E. E. Acute and sub-chronic (28-day) oral toxicity studies of hydroalcohol leaf extract of *Ageratum conyzoides* L (Asteraceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 5, p. 463–467, 2010.

DITTRICH, A.; HESSENKEMPER, W.; SCHAPER, F. Systems biology of IL-6, IL-12 family cytokines. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 5, p. 595–602, 2015.

DORWARD, D. A.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G.; HASLETT, C.; DHALIWAL, K. 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. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.05.006>>.

DOS REIS, G. O.; VICENTE, G.; DE CARVALHO, F. K.; HELLER, M.; MICKE, G. A.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, T. S. *Croton antisiphiliticus* Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **Inflammopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 115–126, 2014.

DURODOLA, J. Antibacterial property of crude extracts from a herbal wound healing remedy – *Ageratum conyzoides*, L. **Planta Medica**, v. 32, n. 8, p. 388–390, 1977. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0028-1097620>>.

ELENKOV, I. J.; HRVAČIĆ, B.; MARKOVIĆ, S.; MESIĆ, M.; KLONKAY, A. Č.; LERMAN, L.; SUČIĆ, A. F.; VUJASINOVIĆ, I.; BOŠNJAK, B.; BRAJŠA, K.; ŽIHER, D.; HULITA, N. K.; MALNAR, I. Synthesis and anti-inflammatory activity of novel furochromenes.

Croatica Chemica Acta, v. 86, n. 3, p. 253–264, 2013.

FONTES, J. A.; ROSE, N. R.; ČIHÁKOVÁ, D. The varying faces of IL-6: from cardiac protection to cardiac failure. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 62–68, 2015.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FRÖDE, T. S.; DA SILVA BUSS, Z.; DOS REIS, G. O.; SANTOS MEDEIROS, Y. Evidence of anti-inflammatory effects of Pioglitazone in the murine pleurisy model induced by carrageenan. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 12, p. 1394–1400, 2009.

FRÖDE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators of inflammation**, v. 10, n. 4, p. 223–227, 2001.

FROST, J. a; GEPPERT, T. D.; COBB, M. H.; FERAMISCO, J. R. A requirement for extracellular signal-regulated kinase (ERK) function in the activation of AP-1 by Ha-Ras, phorbol 12-myristate 13-acetate, and serum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 3844–3848, 1994.

FU, J.; CUPPEN, B. V. J.; WELSING, P. M. J.; VAN WIETMARSCHEN, H.; HARMS, A. C.; BERGER, R.; KOVAL, S.; FRITSCH-STORK, R. D. E.; BIJLSMA, J. W. J.; HANKEMEIER, T.; VAN DER GREEF, J.; LAFEBER, F. P. J. G. Differences between serum polar lipid profiles of male and female rheumatoid arthritis patients in response to glucocorticoid treatment. **Inflammopharmacology**, p. 1–6, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10787-016-0284-1>>.

FU, Y.; CHEN, J.; LI, Y.; ZHENG, Y.; LI, P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1063–1071, 2013.

FUJISAWA, K.; AONO, H.; HASUNUMA, T.; YAMAMOTO, K.; MITA, S.; NISHIOKA, K. Activation of transcription factor NF-kappa B in human synovial cells in response to tumor necrosis factor alpha. **Arthritis and Rheumatism**, v. 39, n. 2, p. 197–203, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8849369>>.

GARCÍA-BELTRÁN, O.; ARECHE, C.; CASSELS, B. K.; CUCA SUÁREZ, L. E. Coumarins isolated from *Esenbeckia alata* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 52, p. 38–40, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2013.12.011>>.

GHATE, M.; KUSANUR, R. A.; KULKARNI, M. V. Synthesis and in vivo analgesic and anti-inflammatory activity of some bi heterocyclic coumarin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 882–887, 2005.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Adenosine deaminase: colorimetric method. In: BERGMEYER, H.-U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. 3. ed. Weinheim: Verlag Chemie Press, 1984. 4p. 315–323.

GLOIRE, G.; LEGRAND-POELS, S.; PIETTE, J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1493–1505, 2006.

GODSELL, J.; RUDLOFF, I.; KANDANE-RATHNAYAKE, R.; HOI, A.; NOLD, M. F.; MORAND, E. F.; HARRIS, J. Clinical associations of IL-10 and IL-37 in systemic lupus erythematosus. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep34604>>.

GOULART, S.; MORITZ, M. I. G.; LANG, K. L.; LIZ, R.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 346–353, 2007.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GROVER, J.; KUMAR, V.; SOBHIA, M. E.; JACHAK, S. M. Synthesis, biological evaluation and docking analysis as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 19, p. 4638–4642, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.08.050>>.

GUGGINO, G.; GIARDINA, A.; FERRANTE, A.; GIARDINA, G.; SCHINOCCA, C.; SIRECI, G.; DIELI, F.; CICCIA, F.; TRIOLO, G. The in vitro addition of methotrexate and/or methylprednisolone

determines peripheral reduction in Th17 and expansion of conventional Treg and of IL-10 producing Th17 lymphocytes in patients with early rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v. 35, n. 1, p. 171–175, 2015.

GULLICK, N. J.; ABOZAID, H. S.; JAYARAJ, D. M.; EVANS, H. G.; SCOTT, D. L.; CHOY, E. H.; TAAMS, L. S. Enhanced and persistent levels of interleukin (IL)-17+CD4+ T cells and serum IL-17 in patients with early inflammatory arthritis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 174, n. 2, p. 292–301, 2013.

HAEGENS, A.; HEERINGA, P.; VAN SUYLEN, R. J.; STEELE, C.; ARATANI, Y.; O'DONOGHUE, R. J. J.; MUTSAERS, S. E.; MOSSMAN, B. T.; WOUTERS, E. F. M.; VERNOOY, J. H. J. Myeloperoxidase deficiency attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation and subsequent cytokine and chemokine production. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 12, p. 7990–7996, 2009. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0800377>>.

HALWANI, R.; AL-KUFAIDY, R.; VAZQUEZ-TELLO, A.; PUREZA, M. A.; BAHAMMAM, A. S.; AL-JAHDALI, H.; ALNASSAR, S. A.; HAMID, Q.; AL-MUHSEN, S. IL-17 enhances chemotaxis of primary human B cells during asthma. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–17, 2014.

HAN, S.; ZHOU, V.; PAN, S.; LIU, Y.; HORNSBY, M.; MCMULLAN, D.; KLOCK, H. E.; HAUGEN, J.; LESLEY, S. A.; GRAY, N.; CALDWELL, J.; GU, X. Identification of coumarin derivatives as a novel class of allosteric MEK1 inhibitors. v. 15, p. 5467–5473, 2005.

HAREL, D.; KHALID, S. A.; KAISER, M.; BRUN, R.; WÜNSCH, B.; SCHMIDT, T. J. Encecalol angelate, an unstable chromene from *Ageratum conyzoides* L.: total synthesis and investigation of its antiprotozoal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 620–625, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.06.015>>.

HART, L. A.; KRISHNAN, V. L.; ADCOCK, I. M.; BARNES, P. J.; CHUNG, K. F. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor- κ B, in asthma. **American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine**, v. 158, p. 1585–1592, 1998.

HASSAN, M.; SHAHID-UD-DAULA, A. F. M.; JAHAN, I. A.; NIMMI, I.; ADNAN, T.; ABDULLAH-AL-MANSUR; HOSSAIN, H. Anti-

inflammatory activity , total flavonoids and tannin content from the ethanolic extract of *Ageratum conyzoides* Linn. leaf. **In J Pharm Phytopharmacol Res**, v. 1, n. 5, p. 234–241, 2012.

HAYASHI, M.; YANABA, K.; UMEZAWA, Y.; YOSHIHARA, Y.; KIKUCHI, S.; ISHIUJI, Y.; SAEKI, H.; NAKAGAWA, H. IL-10-producing regulatory B cells are decreased in patients with psoriasis. **Journal of Dermatological Science**, v. 81, n. 2, p. 93–100, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.11.003>>.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B in immunobiology. **Cell research**, v. 21, n. 2, p. 223–244, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3193440&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 3, p. 253–266, 2014.

HAZLETON, L. W.; TUSING, T. W.; ZEITLIN, B. R.; THIESSEN, J. R.; MURER, H. K. Toxicity of coumarin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 118, n. 3, p. 348–358, 1956.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: principles and challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 149–160, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.014>>.

HEDRICH, C. M.; RAUEN, T.; APOSTOLIDIS, S. a; GRAMMATIKOS, A. P.; RODRIGUEZ RODRIGUEZ, N.; IOANNIDIS, C.; KYTTARIS, V. C.; CRISPIN, J. C.; TSOKOS, G. C. Stat3 promotes IL-10 expression in lupus T cells through trans-activation and chromatin remodeling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 37, p. 13457–13462, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4169908&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HEIER, C. R.; FIORILLO, A. A.; CHAISSON, E.; GORDISH-DRESSMAN, H.; HATHOUT, Y.; DAMSKER, J. M.; HOFFMAN, E. P.; CONKLIN, L. S. Identification of pathway-specific serum biomarkers of response to glucocorticoid and infliximab treatment in children with inflammatory bowel disease. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 7, n. 9, p. e192, 2016. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doi/10.1038/ctg.2016.49>>.

HUA, K.; YANG, S.; KAO, T.; CHANG, J.; CHEN, H.; TSAI, Y.; CHEN, A.; YANG, S.; CHAO, L. K.; KA, S. Osteole mitigates progressive IgA nephropathy by inhibiting reactive oxygen species generation and NF- κ B/NLRP3 pathway. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

HUANG, A.-X.; LU, L.-W.; LIU, W.-J.; HUANG, M. Plasma inflammatory cytokine IL-4, IL-8, IL-10, and TNF- α levels correlate with pulmonary function in patients with asthma-chronic obstructive pulmonary disease (COPD) overlap syndrome. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 2800–2808, 2016. Disponível em: <<http://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/896458>>.

IGE, O.; EDEM, V. F.; ARINOLA, O. G. Plasma adenosine deaminase enzyme reduces with treatment of pulmonary tuberculosis in nigerian patients: indication for diagnosis and treatment monitoring. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, v. 31, p. 49–53, 2016.

IKONOMI, E.; ROTHSTEIN, R. D.; EHRlich, A. C.; FRIEDENBERG, F. K. Measurement of fractional exhaled nitric oxide as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease. **Journal of Gastroenterology, Pancreatology & Liver Disorders**, v. 3, n. 1, p. 1–13, 2016.

INGALE, N.; MADDI, V.; PALKAR, M.; RONAD, P.; MAMLEDESAI, S.; VISHWANATHSWAMY, A. H. M.; SATYANARAYANA, D. Synthesis and evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of 3-[(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl-thio)acetyl]-2H-chromen-2-ones. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 16–26, 2012.

INGERSOLL, S. A.; LAROUÏ, H.; KOLACHALA, V. L.; WANG, L.; GARG, P.; DENNING, T. L.; GEWIRTZ, A. T.; MERLIN, D.; SITARAMAN, S. V. A2BAR expression in non-immune cells plays an important role in the development of murine colitis. **Digestive and Liver Disease**, v. 44, n. 10, p. 819–826, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3436952&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ISAILOVIC, N.; DAIGO, K.; MANTOVANI, A.; SELMI, C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. **Journal of Autoimmunity**, v. 60, p. 1–11, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2015.04.006>>.

JAISWAL, Y.; LIANG, Z.; ZHAO, Z. Botanical drugs in Ayurveda and Traditional Chinese Medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 245–259, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.052>>.

JANG, H. R.; RABB, H. Immune cells in experimental acute kidney injury. **Nature Reviews. Nephrology**, v. 11, n. 2, p. 88–101, 2015. Disponível em: <http://www.nature.com/nrneph/journal/v11/n2/full/nrneph.2014.180.html?WT.mc_id=LAN_NatRevNeph_1511_NRCLIN10ANNIVERSAR_Y_PORTFOLIO>.

JIN, P.; ZHAO, Y.; LIU, H.; CHEN, J.; REN, J.; JIN, J.; BEDOGNETTI, D.; LIU, S.; WANG, E.; MARINCOLA, F.; STRONCEK, D. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α polarize bone marrow stromal cells uniformly to a Th1 phenotype. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4876328&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

JOVANOVIC, D. V.; DI BATTISTA, J. A.; MARTEL-PELLETIER, J.; JOLICOEUR, F. C.; HE, Y.; ZHANG, M.; MINEAU, F.; PELLETIER, J. P. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. **Journal of immunology**, v. 160, n. 7, p. 3513–3521, 1998. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/160/7/3513.full>>.

JUCAITE, A.; SVENNINGSSON, P.; RINNE, J. O.; CSELÉNYI, Z.; VARNÄS, K.; JOHNSTRÖM, P.; AMINI, N.; KIRJAVAINEN, A.; HELIN, S.; MINKWITZ, M.; KUGLER, A. R.; POSENER, J. A.; BUDD, S.; HALLDIN, C.; VARRONE, A.; FARDE, L. Effect of the myeloperoxidase inhibitor AZD3241 on microglia: A PET study in Parkinson's disease. **Brain**, v. 138, n. 9, p. 2687–2700, 2015.

KABEYA, L. M.; FUZISSAKI, C. N.; TALEB-CONTINI, S. H.; MARIA, A.; FERREIRA, C.; NAAL, Z.; SANTOS, E. O. L.; FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G.; ELISA, A.; AZZOLINI, C. S.; VERMELHO, R. B.; MALVEZZI, A.; AMARAL, A. T.; LUIS, J.; LOPES, C.; LUCISANO-VALIM, Y. M. 7-Hydroxycoumarin modulates the oxidative metabolism, degranulation and microbial killing of human neutrophils. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, n. 1, p. 63–

75, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.08.010>>.

KALJAS, Y.; LIU, C.; SKALDIN, M.; WU, C.; ZHOU, Q.; LU, Y.; AKSENTIJEVICH, I.; ZAVIALOV, A. V. Human adenosine deaminases ADA1 and ADA2 bind to different subsets of immune cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1–16, 2016.

Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-016-2357-0>>.

KALKHAMBKAR, R. G.; ARIDOSS, G.; KULKARNI, G. M.; BAPSET, R. M.; MUDARADDI, T. Y.; PREMKUMAR, N.; JEONG, Y. T.

Synthesis and biological activities of novel ethers of quinolinone linked with coumarins. **Monatshefte für Chemie**, v. 142, p. 305–315, 2011.

KANCHEVA, V. D.; SASO, L.; BORANOVA, P. V.; KHAN, A.; SAROJ, M. K.; PANDEY, M. K.; MALHOTRA, S.; NECHEV, J. Z.; SHARMA, S. K.; PRASAD, A. K.; GEORGIEVA, M. B.; JOSEPH, C.; DEPASS, A. L.; RASTOGI, R. C.; PARMAR, V. S. Structure-activity relationship of dihydroxy-4-methylcoumarins as powerful antioxidants: correlation between experimental & theoretical data and synergistic effect. **Biochimie**, v. 92, n. 9, p. 1089–1100, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.06.012>>.

KAPOOR, M.; MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; PELLETIER, J.-P.; FAHMI, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 7, n. 1, p. 33–42, 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2010.196>>.

KARTHIKEYAN, R.; KANIMOZHI, G.; PRASAD, N. R.; AGILAN, B.; GANESAN, M.; MOHANA, S.; SRITHAR, G. 7-Hydroxycoumarin prevents UVB-induced activation of NF- κ B and subsequent overexpression of matrix metalloproteinases and inflammatory markers in human dermal fibroblast cells. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 161, p. 170–176, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.04.027>>.

KEERTHY, H. K.; MOHAN, C. D.; SIVEEN, K. S.; FUCHS, J. E.; RANGAPPA, S.; SUNDARAM, M. S.; LI, F.; GIRISH, K. S.; SETHI, G.; BENDER, A.; RANGAPPA, K. S. Novel synthetic biscoumarins target Tumor Necrosis Factor- α in hepatocellular carcinoma in vitro

and in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 46, p. 31879–31890, 2014.

KHODE, S.; MADDI, V.; ARAGADE, P.; PALKAR, M.; KUMAR, P.; MAMLEDESAI, S.; THIPPESWAMY, A. H. M.; SATYANARAYANA, D. Synthesis and pharmacological evaluation of a novel series of 5-(substituted) aryl-3-(3-coumarinyl)-1-phenyl-2-pyrazolines as novel anti-inflammatory and analgesic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1682–1688, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.09.020>>.

KIM, I. S.; KIM, D.; LEE, J. A (S)-(+)-decursin derivative, (S)-(+)-3-(3,4-dihydroxy-phenyl)- acrylic acid 2,2-dimethyl-8-oxo-3,4-dihydro-2H,8H-pyrano[3,2-g]- chromen-3-yl-ester, attenuates the development of atopic dermatitis-like lesions in NC/Nga mice. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 2541–2548, 2013.

KIM, I. S.; SONG, G.; KIM, D.; HYUN, S.; YUN, C.; LEE, J. Effect of (E)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-7-yl-3-(3,4-dimethoxyphenyl) acrylate on the development of atopic dermatitis-like lesions. **Life Sciences**, v. 91, n. 9–10, p. 338–344, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.07.021>>.

KING, E. M.; CHIVERS, J. E.; RIDER, C. F.; MINNICH, A.; GIEMBYCZ, M. A.; NEWTON, R. Glucocorticoid repression of inflammatory gene expression shows differential responsiveness by transactivation- and transrepression-dependent mechanisms. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2013.

KLEBANOFF, S. J.; KETTLE, A. J.; ROSEN, H.; WINTERBOURN, C. C.; NAUSEEF, W. M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 2, p. 185–198, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3545676&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0712349>>.

KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 6, p. 1157–62, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20807706>>.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and

function in health and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–75, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435331>>.

KOLATTUKUDY, P. E.; NIU, J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway. **Circulation Research**, v. 110, n. 1, p. 174–189, 2012.

KOTTKE, M. A.; WALTERS, T. J. Where's the leak in vascular barriers? a review. **Shock**, v. 46, p. 2016, 2016.

KREMENTSOV, D. N.; THORNTON, T. M.; TEUSCHER, C.; RINCON, M. The emerging role of p38 mitogen-activated protein kinase in multiple sclerosis and its models. **Molecular and Cellular Biology**, v. 33, n. 19, p. 3728–3734, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3811866&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

KRIETE, A.; MAYO, K. L. Atypical pathways of NF- κ B activation and aging. **Experimental Gerontology**, v. 44, n. 4, p. 250–255, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2008.12.005>>.

KUMAR, S.; BOEHM, J.; LEE, J. C. P38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 2, n. 9, p. 717–726, 2003. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0142026209&partnerID=40&md5=86ddf1f3620a7a0ec60bbc1bf48f3fda>>.

KUMAR, S.; SINGH, B. K.; KALRA, N.; KUMAR, V.; KUMAR, A.; PRASAD, A. K.; RAJ, H. G.; PARMAR, S.; GHOSH, B. Novel thiocoumarins as inhibitors of TNF- α induced ICAM-1 expression on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and microsomal lipid peroxidation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1605–1613, 2005.

KUPRIYANOVA, G. S. NMR studies of the electronic structure of coumarins. **Journal of Structural Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 495–502, 1997.

KUROKAWA, M.; IMAKITA, M.; SHIRAKI, K. Cytokine-modulatory activity and therapeutic efficacy of 7-amino-4- methylcoumarin in murine collagen-induced arthritis. **The Open Bioactive Compounds Journal**, v. 3, p. 12–17, 2010.

KUROSAWA, M.; NUMAZAWA, S.; TANI, Y.; YOSHIDA, T. A. ERK signaling mediates the induction of inflammatory cytokines by bufalin in human monocytic cells. **The American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 278, n. 3, p. C500–C508, 2000.

LA, V. D.; ZHAO, L.; EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; GRENIER, D. Anti-inflammatory and wound healing potential of citrus auraptene. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 10, p. 961–964, 2013.

LEE, T.; CHEN, Y.; HWANG, T.; SHU, C. New coumarins and anti-inflammatory constituents from the fruits of *Cnidium monnieri*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 9566–9578, 2014.

LEE, Y. G.; JEONG, J. J.; NYENHUIS, S.; BERDYSHEV, E.; CHUNG, S.; RANJAN, R.; KARPURAPU, M.; DENG, J.; QIAN, F.; KELLY, E. A. B.; JARJOUR, N. N.; ACKERMAN, S. J.; NATARAJAN, V.; CHRISTMAN, J. W.; PARK, G. Y. Recruited alveolar macrophages, in response to airway epithelial-derived monocyte chemoattractant protein 1/CCL2, regulate airway inflammation and remodeling in allergic asthma. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 52, n. 6, p. 772–784, 2015.

LEI, L.; XUE, Y.; LIU, Z.; PENG, S.; HE, Y.; ZHANG, Y.; FANG, R.; WANG, J.; LUO, Z.; YAO, Gu.; ZHANG, J.; ZHANG, G.; SONG, H.; ZHANG, Y. Coumarin derivatives from *Ainsliaea fragrans* and their anticoagulant activity. **Scientific Reports**, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep13544>>.

LEMESCH, S.; RIBITSCH, W.; SCHILCHER, G.; SPINDELBOCK, W.; HAFNER-GIESSAU, H.; MARSCHE, G.; PASTERK, L.; PAYERL, D.; SCHMERBOCK, B.; TAWDROUS, M.; ROSENKRANZ, A. R.; STIEGLER, P.; KAGER, G.; HALLSTRÖM, S.; OETTL, K.; EBERHARD, K.; HORVATH, A.; LEBER, B.; STADLBAUER, V. Mode of renal replacement therapy determines endotoxemia and neutrophil dysfunction in chronic kidney disease. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep34534>>.

LEVAST, B.; LI, Z.; MADRENAS, J. The role of IL-10 in microbiome-associated immune modulation and disease tolerance. **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 291–301, 2015.

LEYVA-ILLADES, D.; CHERLA, R. P.; LEE, M. S.; TESH, V. L. Regulation of cytokine and chemokine expression by the ribotoxic stress response elicited by shiga toxin type 1 in human macrophage-like THP-1 cells. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 2109–2120, 2012.

LI, Y. J.; WANG, C. Y.; YE, M. Y.; YAO, G. Y.; WANG, H. S. Novel coumarin-containing aminophosphonates as antitumor agent: synthesis, cytotoxicity, DNA-Binding and apoptosis evaluation. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14791–14809, 2015.

LI, Z.; HU, J.; SUN, M.; JI, H.; ZHAO, M.; WU, D.; LI, G.; LIU, G.; CHEN, N. Effect of compound IMMLG5521, a novel coumarin derivative, on carrageenan-induced pleurisy in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 661, p. 118–123, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.024>>.

LI, Z.; HU, J.; SUN, M.; SONG, X.; LI, G.; LIU, Y.; LI, G.; JI, H.; LIU, G.; CHEN, N. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of IMMLG5521, a coumarin derivative. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 400–403, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.007>>.

LIM, H. J.; LEE, J. H.; CHOI, J. S.; LEE, S. K.; KIM, Y. S.; KIM, H. P. Inhibition of airway inflammation by the roots of *Angelica decursiva* and its constituent, columbianadin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1353–1361, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.033>>.

LIM, S. J.; KIM, M.; RANDY, A.; NAM, E. J.; NHO, C. W. Effects of *Hovenia dulcis* Thunb. extract and methyl vanillate on atopic dermatitis-like skin lesions and TNF- α /IFN- γ -induced chemokines production in HaCaT cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, p. 1–15, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jphp.12640>>.

LIMA, G. R. M.; MONTENEGRO, C. A.; ALMEIDA, C. L. F.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Database survey of anti-inflammatory plants in South America: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 4, p. 2692–2749, 2011.

LIN, C.; HUANG, S.; LEE, F.; KUO, H.; LIN, M. 6-Acyl-4-aryl/alkyl-5,7-dihydroxycoumarins as anti-inflammatory agents. **Bioorganic &**

Medicinal Chemistry, v. 14, p. 4402–4409, 2006.

LIU, J.; ZHAN, X.; WAN, J.; WANG, Y.; WANG, C. Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: favourable physical features versus adverse biological effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 27–36, 2015.

LIU, Z.; LIU, J.; ZHAO, K.; SHI, Q.; ZUO, T.; WANG, G.; WANG, W. Role of daphnetin in rat severe acute pancreatitis through the regulation of TLR4/NF- κ B signaling pathway activation. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 44, n. 1, p. 149–163, 2016. Disponível em:
<<http://www.worldscientific.com/doi/10.1142/S0192415X16500105>>.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. Disponível em:
<http://www.life.illinois.edu/biochem/355/articles/LowryJBC193_265.pdf>.

LUCHINI, A. C.; RODRIGUES-ORSI, P.; CESTARI, S. H.; SEITO, L. N.; WITAICENIS, A.; PELLIZZON, C. H.; STASI, L. C. Di. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 7, p. 1343–1350, 2008.

LUKEY, P. T. Single doses of p38 MAP kinase inhibitors or prednisolone affect CRP and IL-6 in patients with active rheumatoid arthritis (RA). **Open Journal of Immunology**, v. 2, n. 3, p. 85–97, 2012.

LV, H.; WANG, S.; ZENG, K.; LI, J.; GUO, X.; FERREIRA, D.; ZJAWIONY, J. K.; TU, P.; JIANG, Y. Anti-inflammatory coumarin and benzocoumarin derivatives from *Murraya alata*. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 279–285, 2015.

MACNEE, W.; ALLAN, R. J.; JONES, I.; DE SALVO, M. C.; TAN, L. F. Efficacy and safety of the oral p38 inhibitor PH-797804 in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised clinical trial. **Thorax**, v. 68, n. 8, p. 738–745, 2013. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23539534>>.

MANNINO, M. H.; ZHU, Z.; XIAO, H.; BAI, Q.; WAKEFIELD, M. R.

The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Letters**, v. 367, p. 103–107, 2015.

MEENA, A.; YADAV, D. K.; SRIVASTAVA, A.; KHAN, F.; CHATTOPADHYAY, S. K. In silico exploration of anti-inflammatory activity of natural coumarinolignoids. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 78, p. 567–579, 2011.

MELAGRAKI, G.; AFANTITIS, A.; IGGLESSI-MARKOPOULOU, O.; DETSI, A.; KOUFAKI, M.; KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOULITINA, D. J. Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 7, p. 3020–3026, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.12.027>>.

METZLER, K. D.; FUCHS, T. a; NAUSEEF, W. M.; REUMAUX, D.; ROESLER, J.; SCHULZE, I.; WAHN, V.; PAPAYANNOPOULOS, V.; ZYCHLINSKY, A.; DC, W. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. **Blood**, v. 117, n. 3, p. 953–959, 2011.

MOGHADAM-KIA, S.; WERTH, V. P. Prevention and treatment of systemic glucocorticoid side effects. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 3, p. 239–248, 2010.

MONTUSCHI, P. Role of leukotrienes and leukotriene modifiers in asthma. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 6, p. 1792–1811, 2010.

MOURA, A. C. A.; SILVA, E. L. F.; FRAGA, M. C. A.; WANDERLEY, A. G.; AFIATPOUR, P.; MAIA, M. B. S. Antiinflammatory and chronic toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides* L. in rats. **Phytomedicine**, v. 12, n. 1–2, p. 138–142, 2005.

NADEEM, A.; SIDDIQUI, N.; ALHARBI, N. O.; ALHARBI, M. M. Airway and systemic oxidant-antioxidant dysregulation in asthma: A possible scenario of oxidants spill over from lung into blood. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 1, p. 31–40, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2014.06.001>>.

NEUMAN, M. G.; COHEN, L. B.; OPRIS, M.; NANAU, R.; JEONG, H. Hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 4, p. 825–843, 2015.

NEWTON, R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? **Thorax**, v. 55, n. 9, p. 603–613, 2000.

NGUYEN, P. H.; ZHAO, B. T.; KIM, O.; LEE, J. H.; CHOI, J. S.; MIN, B. S.; WOO, M. H. Anti-inflammatory terpenylated coumarins from the leaves of *Zanthoxylum schinifolium* with α -glucosidase inhibitory activity. **Journal of Natural Medicines**, v. 70, n. 2, p. 276–281, 2016.

NI, G.; WANG, T.; WALTON, S.; ZHU, B.; CHEN, S.; WU, X.; WANG, Y.; WEI, M. Q.; LIU, X. Manipulating IL-10 signalling blockade for better immunotherapy. **Cellular Immunology**, v. 293, n. 2, p. 126–129, 2015.

NIU, N.; LI, B.; HU, Y.; LI, X.; LI, J.; ZHANG, H. Protective effects of scoparone against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 127–133, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.014>>.

NIU, X.; HUANG, Z.; ZHANG, L.; REN, X.; WANG, J. Auraptene has the inhibitory property on murine T lymphocyte activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 750, p. 8–13, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.017>>.

NIU, X.; WANG, Y.; LI, W.; MU, Q.; LI, H.; YAO, H.; ZHANG, H. International immunopharmacology protective effects of isofraxidin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **International Immunopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 432–439, 2015b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.12.041>>.

NIU, X.; XING, W.; LI, W.; FAN, T.; HU, H.; LI, Y. Isofraxidin exhibited anti-inflammatory effects in vivo and inhibited TNF- α production in LPS-induced mouse peritoneal macrophages in vitro via the MAPK pathway. **International Immunopharmacology**, v. 14, n. 2, p. 164–171, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2012.06.022>>.

NOUR, A. M. M.; KHALID, S. A.; KAISER, M.; BRUN, R.; ABDALLA, W. E.; SCHMIDT, T. J. The antiprotozoal activity of methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 1, p. 127–130, 2010.

OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. **Nature Immunology Immunol**, v. 12, n. 8,

p. 695–708, 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21772278>>.

OKUNADE, A. L. *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 73, p. 1–16, 2002. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X01003641>>.

OKUYAMA, S.; MINAMI, S.; SHIMADA, N.; MAKIHATA, N.; NAKAJIMA, M.; FURUKAWA, Y. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of auraptene, a citrus coumarin, following cerebral global ischemia in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, p. 118–123, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.043>>.

PAN, R.; DAI, Y.; GAO, X.; XIA, Y. Scopolin isolated from *Erycibe obtusifolia* Benth stems suppresses adjuvant-induced rat arthritis by inhibiting inflammation and angiogenesis. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 7–8, p. 859–869, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2009.02.019>>.

PANDEY, M. K.; BALWANI, S.; SHARMA, P. K.; PARMAR, V. S.; GHOSH, B.; WATTERSON, A. Design, synthesis and anti-inflammatory evaluation of PEGylated 4-methyl and 4,8-dimethylcoumarins. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 134–140, 2010.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; FERNANDA, M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of e**, v. 110, p. 323–333, 2007.

PASTUHOV, S. I.; HISAMOTO, N.; MATSUMOTO, K. MAP kinase cascades regulating axon regeneration in *C. elegans*. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 91, n. 3, p. 63–75, 2015. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab/91/3/91_PJA9103B-02/_article>.

PETROVSKA, B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.

PRAJAPATI, V. D.; MAHERIYA, P. M.; JANI, G. K.; SOLANKI, H. K. Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, n. 1, p. 97–112, 2014. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.067>>.

PREDONZANI, A.; CALÌ, B.; AGNELLINI, A. H.; MOLON, B.
Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species:
when inflammation says nitric oxide. **World Journal of
Experimental Medicine**, v. 5, n. 2, p. 64–76, 2015. Disponível em:
<[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4436941
&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4436941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)>.

PROKOPOWICZ, Z.; MARCINKIEWICZ, J.; KATZ, D. R.; CHAIN, B.
M. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. **Archivum
Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 60, n. 1, p. 43–54,
2012.

RAHMAN, A. Analgesic and anti-inflammatory effect of whole
Ageratum conyzoides and *Emilia sonchifolia* alcoholic extracts in
animal models. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**,
v. 6, n. 20, p. 1469–1476, 2012.

RAO, T. S.; CURRIE, J. L.; SHAFFER, A. F.; ISAKSON, P. C.
Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and
tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation.
Inflammation, v. 17, n. 6, p. 723–741, 1993.

RASK-ANDERSEN, M.; ZHANG, J.; FABBRO, D.; SCHIÖTH, H. B.
Advances in kinase targeting: current clinical use and clinical trials.
Trends in Pharmacological Sciences, v. 35, n. 11, p. 604–620,
2014.

RATH, T.; BILLMEIER, U.; WALDNER, M. J.; ATREYA, R.;
NEURATH, M. F. From physiology to disease and targeted therapy:
interleukin-6 in inflammation and inflammation-associated
carcinogenesis. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 4, p. 541–554,
2015.

RAY, R. S.; KATYAL, A. Myeloperoxidase: bridging the gap in
neurodegeneration. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.
68, p. 611–620, 2016. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.031>>.

REBER, L.; VERMEULEN, L.; HAEGEMAN, G.; FROSSARD, N.
Ser276 phosphorylation of NF- κ B p65 by MSK1 controls SCF
expression in inflammation. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, 2009.

RIM, H.; CHO, W.; SUNG, S. H.; LEE, K. Nodakenin suppresses

lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophage cells by inhibiting tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 and Nuclear Factor- κ B pathways and protects mice from lethal endotoxin shock. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 342, n. 3, p. 654–664, 2012.

ROCHA, F. A. G. da; ARAÚJO, M. F. F. de; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. da. The therapeutic use of flora in world history. **Holos**, v. 1, n. 0, p. 49–61, 2015. Disponível em: <<http://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/2492>>.

ROEDER, E.; WIEDENFELD, H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids used in the traditional indian medicine - including ayurveda. **Pharmazie**, v. 68, n. 2, p. 83–92, 2013.

ROHINI, K.; SRIKUMAR, P. Therapeutic role of coumarins and coumarin-related compounds. **Journal of Thermodynamics & Catalysis**, v. 5, n. 1, p. 5–7, 2014. Disponível em: <<http://omicsonline.org/open-access/therapeutic-role-of-coumarins-and-coumarinrelated-compounds-2157-7544-5-130.php?aid=27937>>.

ROSENBLUM, M. D.; WAY, S. S.; ABBAS, A. K. Regulatory T cell memory. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 2, p. 1–12, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nri.2015.1>>.

ROSSER, E. C.; OLEINIK, K.; TONON, S.; DOYLE, R.; BOSMA, A.; CARTER, N. A.; HARRIS, K. A.; JONES, S. A.; KLEIN, N.; MAURI, C. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 β and interleukin-6 production. **Nature Medicine**, v. 20, n. 11, p. 1334–1339, 2014.

ROUGER, C.; DERBRÉ, S.; CHARREAU, B.; PABOIS, A.; CAUCHY, T.; LITAUDON, M.; AWANG, K.; RICHOMME, P. Lepidotol A from *Mesua lepidota* inhibits inflammatory and immune mediators in human endothelial cells. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 2187–2197, 2015.

SACCANI, S.; PANTANO, S.; NATOLI, G. p38-dependent marking of inflammatory genes for increased NF- κ B recruitment. **Nature Immunology**, v. 3, n. 1, p. 69–75, 2002.

SAGHIRI, R.; GHASHGHAI, N.; MOVASEGHI, S.; POURSHARIFI, P.; JALILFAR, S.; BIDHENDI, M. A.; GHAZIZADEH, L.; EBRAHIMI-

RAD, M. Serum adenosine deaminase activity in patients with systemic lupus erythematosus: a study based on ADA1 and ADA2 isoenzymes pattern. **Rheumatology International**, v. 32, n. 6, p. 1633–1638, 2012.

SAHU, D.; KUMAR, S.; GAUTAM, H.; DAS, H. R. A novel coumarin derivative, 8-methoxy chromen-2-one alleviates collagen induced arthritis by down regulating nitric oxide, NF- κ B and proinflammatory cytokines. **International Immunopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 891–900, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.08.012>>.

SAKLATVALA, J. The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 372–377, 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. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15472.x>>.

SALIM, E.; KUMOLOASASI, E.; JANTAN, I. Inhibitory effect of selected medicinal plants on the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Natural Medicines**, v. 68, n. 3, p. 647–653, 2014.

SANDOUGHI, M.; SALIMI, S.; ZAKERI, Z.; DARBANDI, E. J.; JAHANTIGH, M.; MOUDI, B. Association of eNOS gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in southeast Iran. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 19, n. 6, p. 606–612, 2016.

SANTOS, J.; MARQUIS, A.; EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; CURINI, M.; GRENIER, D. Collinin reduces porphyromonas gingivalis growth and collagenase activity and inhibits the lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory response and osteoclast differentiation and function. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 5, p. 704–711, 2013.

SANTOS, S. S.; BRUNIALTI, M. K. C.; RIGATO, O.; MACHADO, F. R.; SILVA, E.; SALOMAO, R. Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients

and association with outcomes. **Shock**, v. 38, n. 1, p. 18–23, 2012.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 1, p. 23–43, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12441176>>.

SCHAPER, F.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6: biology, signaling and strategies of blockade. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 5, p. 475–487, 2015.

SCHURGERS, E.; BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon- γ . **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 12, p. 917–926, 2011.

SEDDER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: from mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 453–472, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>>.

SEDDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents and Actions**, v. 18, n. 3–4, p. 439–446, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3463171>>.

SHARMA, S.; CHATTOPADHYAY, S. K.; TRIVEDI, P.; BAWANKULE, D. U. Synthesis and anti-inflammatory activity of derivatives of coumarino-lignoid, cleomiscosin A and its methyl ether. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 5150–5156, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.08.027>>.

SHARMA, S.; KUMAR, S.; KUMAR, D.; KHAN, F.; MOHANTY, S.; MAURYA, A.; UMRAO, D. QSAR, docking and in vitro studies for anti-inflammatory activity of cleomiscosin A methyl ether derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 952–964, 2012.

SHI, Y.; ZHANG, B.; CHEN, X.; XU, D.; WANG, Y.; DONG, H.; MA, S.; SUN, R.; HUI, Y.; LI, Z. Osthole protects lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by preventing down-regulation of angiotensin-converting enzyme 2. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 819–824, 2013.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.031>>.

SHIMIZU, K.; KONNO, S.; OZAKI, M.; UMEZAWA, K.; YAMASHITA, K.; TODO, S.; NISHIMURA, M. Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a novel NF-kappaB inhibitor, inhibits allergic inflammation and airway remodelling in murine models of asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 42, n. 8, p. 1273–1281, 2012.

SILVA, P. S. C.; FRANCISCONI, L. S.; GONÇALVES, R. D. M. R. Evaluation of major and trace elements in medicinal plants. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 0, n. 0, p. 1–17, 2016.

SINGH, S. B.; DEVI, W. R.; MARINA, A.; DEVI, W. I.; SWAPANA, N.; SINGH, C. B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Ageratum conyzoides* Linn (Asteraceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 8, p. 371–385, 2013.

SKALICKA-WOŹNIAK, K.; ORHAN, I. E.; CORDELL, G. A.; NABAVI, S. M.; BUDZYŃSKA, B. Implication of coumarins towards central nervous system disorders. **Pharmacological Research**, v. 103, p. 188–203, 2016.

SOLOAGA, A.; THOMSON, S.; WIGGIN, G. R.; RAMPERSAUD, N.; DYSON, M. H.; HAZZALIN, C. A.; MAHADEVAN, L. C.; ARTHUR, J. S. C. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. **EMBO Journal**, v. 22, n. 11, p. 2788–2797, 2003.

SONG, B.; WANG, Z.; LIU, Y.; XU, S.; HUANG, G.; XIONG, Y.; ZHANG, S.; XU, L.; DENG, X.; GUAN, S. Immunosuppressive activity of daphnetin, one of coumarin derivatives, is mediated through suppression of NF-κB and NFAT signaling pathways in mouse T cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–11, 2014.

SONG, Y.; KIM, Y. H. R.; KIM, S. M.; AIN, Q. U.; JANG, K.; YANG, C. S.; KIM, Y. H. R. RNAi-mediated silencing of TNF-alpha converting enzyme to down-regulate soluble TNF-alpha production for treatment of acute and chronic colitis. **Journal of Controlled Release**, v. 239, p. 231–241, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27562600>>.

STAMP, L. K.; KHALILOVA, I.; TARR, J. M.; SENTHILMOHAN, R.; TURNER, R.; HAIGH, R. C.; WINYARD, P. G.; KETTLE, A. J. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 51, n. 10, p. 1796–1803, 2012.

SU, X.; HUANG, Q.; CHEN, J.; WANG, M.; PAN, H.; WANG, R.; ZHOU, H.; ZHOU, Z.; LIU, J.; YANG, F.; LI, T.; LIU, L. Calycosin suppresses expression of pro-inflammatory cytokines via the activation of p62/Nrf2-linked heme oxygenase 1 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Pharmacological Research**, v. 113, p. 695–704, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661816303607>>.

SUN, J.; RAMNATH, R. D.; TAMIZHSELVI, R.; BHATIA, M. Neurokinin A engages neurokinin-1 receptor to induce NF- κ B-dependent gene expression in murine macrophages: implications of ERK1/2 and PI3-kinase/Akt pathways. **The American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 295, p. 679–691, 2008.

SUN, Y.; LIU, W.; LIU, T.; FENG, X.; YANG, N.; ZHOU, H. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 9893, p. 1–5, 2015.

ŚWIERKOT, J.; NOWAK, B.; CZARNY, A.; ZACZYŃSKA, E.; SOKOLIK, R.; MADEJ, M.; KORMAN, L.; SEBASTIAN, A.; WOJTALA, P.; LUBIŃSKI, Ł.; WILAND, P. The activity of JAK/STAT and NF- κ B in patients with rheumatoid arthritis. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 25, n. 4, p. 709–717, 2016. Disponível em: <<http://www.advances.umed.wroc.pl/en/article/2016/25/4/709/>>.

SYMEONIDIS, T.; FYLAKTAKIDOU, K. C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; LITINAS, K. E. Synthesis and anti-inflammatory evaluation of novel angularly or linearly fused coumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 5012–5017, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.09.004>>.

SZALAI, C.; KOZMA, G. T.; NAGY, A.; BOJSZKÓ, Á.; KRIKOVSZKY, D.; SZABÓ, T.; FALUS, A. Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 3, p. 375–381, 2001.

SZYMANSKA, E.; SKOWRONEK, A.; MIACZYNSKA, M. Impaired dynamin 2 function leads to increased AP-1 transcriptional activity through the JNK/c-Jun pathway. **Cellular Signalling**, v. 28, n. 1, p. 160–171, 2016.

TANG, W.-J.; ZHANG, Y.-L.; XIAO, Q.-P.; HUANG, C.; JIN, Y.; LI, J. Four flavanocoumarins from the leaves of *Litsea coreana* Levl. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, p. 1128–1132, 2013.

TOGNA, A. R.; FIRUZI, O.; LATINA, V.; PARMAR, V. S.; PRASAD, A. K.; SALEMME, A.; TOGNA, I.; SASO, L. 4-Methylcoumarin derivatives with anti-inflammatory effects in activated microglial cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 1, p. 60–66, 2014.

TONG, L.; CHEN, T.; CHEN, Z.; ZHANG, P.; PI, H.; RUAN, H.; WU, J. Anti-inflammatory activity of omphalocarpin isolated from *Radix Toddaliae* Asiaticae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1553–1560, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.055>>.

TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; DIZ-FILHO, E. B. S.; OLIVEIRA, S. C. B.; TOYAMA, M. H. Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Toxicon**, v. 53, n. 4, p. 417–426, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.018>>.

TRIFUNOVIĆ, J.; MILLER, L.; DEBELJAK, Ž.; HORVAT, V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression-a review. **Biochemia Medica**, v. 25, n. 1, p. 36–48, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4401305&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

TSAI, Y.; YU, H.; CHUNG, P.; LEU, Y. Osthol attenuates neutrophilic oxidative stress and hemorrhagic shock-induced lung injury via inhibition of phosphodiesterase 4. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 387–400, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.008>>.

TSUJI, R. F.; HOSHINO, K.; NORO, Y.; TSUJI, N. M.; KUROKAWA, T.; MASUDA, T.; AKIRA, S.; NOWAK, B. Suppression of allergic reaction by λ -carrageenan: Toll-like receptor 4/MyD88-dependent and-independent modulation of immunity. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 33, p. 249–258, 2003.

TURNER, P. V; BRABB, T.; PEKOW, C.; VASBINDER, M. a. Administration of substances to laboratory animals: routes of

administration and factors to consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 600–613, 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22330705>>.

TZIKAS, S.; SCHLAK, D.; SOPOVA, K.; GATSIUO, A.; STAKOS, D.; STAMATELOPOULOS, K.; STELLOS, K.; LASKE, C. Increased myeloperoxidase plasma levels in patients with alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 39, n. 3, p. 557–564, 2014.

UKWE, V. C.; EPUEKE, E. A.; EKWUNIFE, O. I.; OKOYE, C.; AKUDOR, G. C.; UBAKA, C. M. Antimalarial activity of aqueous extract and fractions of leaves of *Ageratum conyzoides* in mice infected with *Plasmodium berghei*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. September 2008, p. 33–38, 2010.

UMAMAHESWARI, M.; MADESWARAN, A.; ASOKKUMAR, K.; SIVASHANMUGAM, T.; SUBHADRADEVI, V.; JAGANNATH, P. Study of potential xanthine oxidase inhibitors: in silico and in vitro biological activity. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 6, p. 117–123, 2011.

VANDEVYVER, S.; DEJAGER, L.; TUCKERMANN, J.; LIBERT, C. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. **Endocrinology**, v. 154, n. 3, p. 993–1007, 2013.

VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSI, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, n. 2, p. 112–119, 2007.

VIGIL DE MELLO, S. V. G.; DA ROSA, J. S.; FACCHIN, B. M.; LUZ, A. B. G.; VICENTE, G.; FAQUETI, L. G.; ROSA, D. W.; BIAVATTI, M. W.; FRÖDE, T. S. Beneficial effect of *Ageratum conyzoides* Linn (Asteraceae) upon inflammatory response induced by carrageenan into the mice pleural cavity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 337–347, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.09.003>>.

VIGNALI, D. A. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How

regulatory T cells work. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 7, p. 523–532, 2008. Disponível em: <isi:000257089200013>.

VILLARINO, a. V.; KANNO, Y.; FERDINAND, J. R.; O'SHEA, J. J. Mechanisms of Jak/STAT Signaling in immunity and disease. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 1, p. 21–27, 2015. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1401867>>.

VINAPAMULA, K. S.; PEMMARAJU, S. V. L. N.; BHATTARAM, S. K.; BITLA, A. R.; MANOHAR, S. M. Serum adenosine deaminase as inflammatory marker in rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 9, p. 8–10, 2015.

VYAS, A. V.; MULCHANDANI, N. B. Structure reinvestigation of conyzorigun, a new chromone from *Ageratum conyzoides*. **Journal of the Chemical Society**, v. 1, p. 2945–2947, 1984. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/1984/p1/p19840002945>>.

WALASEK, M.; GRZEGORCZYK, A.; MALM, A.; SKALICKA-WOZNIAK, K. Bioactivity-guided isolation of antimicrobial coumarins from *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (Apiaceae) fruits by high-performance counter-current chromatography. **Food Chemistry**, v. 186, p. 133–138, 2015.

WALTZ, P.; ESCOBAR, D.; BOTERO, A. M.; ZUCKERBRAUN, B. S. Nitrate/nitrite as critical mediators to limit oxidative injury and inflammation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 4, p. 328–339, 2015.

WANG, J. B.; LI, H.; WANG, L. L.; LIANG, H. Da; ZHAO, L.; DONG, J. Role of IL-1 β , IL-6, IL-8 and IFN- γ in pathogenesis of central nervous system neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 9, p. 16658–16663, 2015.

WANG, J.; LU, J.; LAN, Y.; ZHOU, H.; LI, W.; XIANG, M. Total coumarins from *Urtica dentata* Hand prevent murine autoimmune diabetes via suppression of the TLR4-signaling pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 379–392, 2013.

WANG, X.; LI, F.; ZHANG, H.; GENG, Y.; YUAN, J.; JIANG, T. Preparative isolation and purification of polymethoxylated flavones from tangerine peel using high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, n. 1–2, p. 188–192, 2005.

WEBB, D. R. Animal models of human disease: inflammation. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 121–130, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.06.014>>.

WEI, J.; XIONG, X.-F.; LIN, Y.-H.; ZHENG, B.-X.; CHENG, D.-Y. Association between serum interleukin-6 concentrations and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. **PeerJ**, v. 3, p. e1199, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4556145&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

WEI, L.; SUN, Y.; KONG, X.-F.; ZHANG, C.; YUE, T.; ZHU, Q.; HE, D.-Y.; JIANG, L.-D. The effects of dopamine receptor 2 expression on B cells on bone metabolism and TNF- α levels in rheumatoid arthritis. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 17, n. 1, p. 1–7, 2016a. Disponível em: <<http://bmcmusculoskeletaldisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12891-016-1220-7>>.

WEI, W.; WU, X. W.; DENG, G. G.; YANG, X. W. Anti-inflammatory coumarins with short- and long-chain hydrophobic groups from roots of *Angelica dahurica* cv. Hangbaizhi. **Phytochemistry**, v. 123, p. 58–68, 2016b.

WILLOUGHBY, A. Human arthritis applied to animal models. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 34, p. 471–478, 1975.

WITAICENIS, A.; LUCHINI, A. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; FELISBINO, S. L.; GARRIDO-MESA, N.; UTRILLA, P.; GÁLVEZ, J.; DI, L. C. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: comparison with prednisolone and sulphasalazine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, n. 1, p. 76–85, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2011.11.004>>.

WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; CHAGAS, S.; DOMINGUES, L.; JUNIOR, D. A.; LUCHINI, A. C.; RODRIGUES-ORSI, P.; CESTARI, S. H.; CLAUDIO, L.; STASI, D. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 240–246, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.001>>.

WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; STASI, L. C. Di. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the

trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, n. 2, p. 211–218, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.03.045>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life. 2.**

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO traditional medicine strategy. **Alternative and Integrative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1–78, 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf>.

XIONG, Y.; WANG, J.; WU, F.; LI, J.; KONG, L. The effects of (\pm)-praeurptorin A on airway inflammation, remodeling and transforming growth factor- β 1 / Smad signaling pathway in a murine model of allergic asthma. **International Immunopharmacology**, v. 14, n. 4, p. 392–400, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2012.08.019>>.

XU, Y. K.; KE, Y.; WANG, B.; LIN, J. H. The role of MCP-1-CCR2 ligand-receptor axis in chondrocyte degradation and disease progress in knee osteoarthritis. **Biological Research**, v. 48, p. 1–8, 2015.

YAMAMOTO, L. A.; SOLDERA, J. C.; EMIM, J. A. S.; GODINHO, R. O.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Pharmacological screening of *Ageratum conyzoides* L. (Mentrasto). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. Suppl.II, p. 145–147, 1991.

YANG, H. J.; YOUN, H.; SEONG, K. M.; YUN, Y. J.; WANYEON, K.; KIM, Y. H.; LEE, J. Y.; LIM, C. S.; JIN, Y.-W.; YOUN, B. Psoralidin , a dual inhibitor of COX-2 and 5-LOX , regulates ionizing radiation (IR) -induced pulmonary inflammation. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 5, p. 524–534, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2011.05.027>>.

YANG, W.-Q.; SONG, Y.-L.; ZHU, Z.-X.; SU, C.; ZHANG, X.; WNAG, J.; SHI, S.-P.; TU, P.-F. Anti-inflammatory dimeric furanocoumarins from the roots of *Angelica dahurica*. **Fitoterapia**, v. 105, p. 187–193, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2015.07.006>>.

YANG, Y.; KIM, S. C.; YU, T.; YI, Y.-S.; RHEE, M. H.; SUNG, G.-H.; YOO, B. C.; CHO, J. Y. Functional roles of p38 mitogen-activated

protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses.

Mediators of Inflammation, p. 1–17, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3977509&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

YAO, R.; FU, Y.; LI, S.; TU, L.; ZENG, X.; KUANG, N. Regulatory effect of daphnetin, a coumarin extracted from *Daphne odora*, on the balance of Treg and Th17 in collagen-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 286–294, 2011.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.08.019>>.

YOKOTA, T.; WANG, Y. P38 MAP kinases in the heart. **Gene**, v. 575, n. 2, p. 369–376, 2016.

YOSHIGAI, E.; MACHIDA, T.; OKUYAMA, T.; MORI, M.; MURASE, H.; YAMANISHI, R.; OKUMURA, T.; IKEYA, Y.; NISHINO, H.; NISHIZAWA, M. Citrus nobiletin suppresses inducible nitric oxide synthase gene expression in interleukin-1 β -treated hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 439, n. 1, p. 54–59, 2013.

YU, W.; LU, Z.; ZHANG, H.; KANG, Y.; MAO, Y.; WANG, H.; GE, W.; SHI, L. Anti-inflammatory and protective properties of daphnetin in endotoxin-induced lung injury. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 12315–12325, 2014a.

YU, W.; WANG, H.; YING, H.; YU, Y.; CHEN, D.; GE, W.; SHI, L. Daphnetin attenuates microglial activation and proinflammatory factor production via multiple signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2014b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.04.005>>.

YUDOH, K.; MATSUNO, H.; NAKAZAWA, F.; YONEZAWA, T.; KIMURA, T. Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 3, p. 617–627, 2000.

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

ZELOVÁ, H.; HOŠEK, J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. **Inflammation Research**, v. 62, n. 7, p. 641–651, 2013.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P.; HAN, Y.; WANG, X. Future perspectives of personalized medicine in traditional Chinese medicine: a systems biology approach. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 20, n. 1–2, p. 93–99, 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctim.2011.10.007>>.

ZHANG, D.-W.; YANG, Y.; YAO, F.; YU, Q. Y.; DAI, S.-J. Solalyratins A and B, new anti-inflammatory metabolites from *Solanum lyratum*. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, p. 362–366, 2012b.

ZHANG, R.; MILLER, R. G.; MADISON, C.; JIN, X.; HONRADA, R.; HARRIS, W.; KATZ, J.; FORSHEW, D. A.; MCGRATHA, M. S. Systemic immune system alterations in early stages of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroimmunology**, v. 256, n. 0, p. 38–42, 2013.

ZHANG, Y.; LI, W.; YANG, X. Biotransformation of columbianadin by rat hepatic microsomes and inhibition of biotransformation products on NO production in RAW 264.7 cells in vitro. **Phytochemistry**, v. 81, p. 109–116, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.06.015>>.

ZHOU, Y.; DI PUCCHIO, T.; SIMS, G. P.; MITTEREDER, N.; MUSTELIN, T. Characterization of the hypercitrullination reaction in human neutrophils and other leukocytes. **Mediators of Inflammation**, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4452437&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.