UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos de *Terminalia argentea* Mart. & Succ e *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina* (Benth.) Brenan

Mirella dos Reis de Araújo Moreira

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos de *Terminalia argentea* Mart. & Succ e *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina* (Benth.) Brenan

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientado(a): Mirella dos Reis de Araújo Moreira
Orientador(a): Lucia Helena Faccioli

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 24/08/2017. A versão original se encontra disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

MOREIRA, Mirella dos Reis de Araújo

Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos de *Terminalia argentea* Mart. & Succ e *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina* (Benth.) Brenan. 2017. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017**.** 72 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Faccioli, Lucia Helena.

1. *Terminalia argentea* 2. *Anadenanthera colubrina* 3.Inflamação 4. Anti-inflamatório

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mirella dos Reis de Araújo Moreira

Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos de *Terminalia argentea* Mart. & Succ e *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina* (Benth.) Brenan.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador(a): Profª. Dra. Lucia Helena Faccioli

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Norma e José, por todo amor e dedicação, pelos exemplos de idoneidade e pela vida que me deram.

Aos meus irmãos André, Thullio e João Pedro por me apoiarem nas minhas decisões, me fortalecerem nos momentos difíceis e cuidarem de mim.

Ao meu noivo Luiz Eduardo pelo companheirismo, paciência e amor.

As minhas tias Ivana e Mary por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus amigos da Caravana do arco-íris, em especial ao Vô Langerton, Tânia, Emerson e Adauto pela confiança no meu trabalho e pelos ensinamentos da fitoterapia.

Agradecimentos

À Deus, pela oportunidade desta vida e da realização deste sonho.

À Profª Drª Lucia Helena Faccioli, minha admirável orientadora, que me acolheu, confiou e possibilitou a realização deste trabalho. Serei eternamente grata.

Ao Prof. Dr. Milton Groppo Júnior, pela colaboração na classificação das espécies vegetais.

Aos meus colaboradores e amigos Ms Caroline Fontanari, Ms Alyne Fávero Galvão Meirelles, Ms Morgana Kelly Borges Prado, Drª Karina Furlani Zoccal e Dr. Carlos Artério Sorgi, pelas discussões e colaboração em todas as etapas deste trabalho.

À Drª Cristiane Tefé Silva, pela colaboração nas análises do material histológico.

Aos professores da Pós- Graduação da FCFRP pela dedicação e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses (LIIP) e Laboratório de Imunologia e Epigenética (LIME), pela convivência e carinho.

Aos funcionários da Seção de Pós- Graduação, em especial, ao Henrique Theodoro pela prontidão e solicitude.

Aos funcionários do Biotério da FCFRP pela atenção e prestatividade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio Financeiro para a realização deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

MOREIRA, M. R. A. **Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos de *Terminalia argentea* Mart. & Succ e *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina* (Benth.) Brenan**. 2017. 72f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017**.**

As plantas medicinais constituem importante fonte para descoberta de novos fármacos. A *Terminalia argentea* Mart. & Succ e a *Anadenanthera colubrina var. colubrina* (Benth.) Brenan, popularmente conhecidas como capitão do campo e angico vermelho respectivamente, são usadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças inflamatórias do trato respiratório. Entretanto, muito pouco se conhece sobre a constituição química e a atividade biológica destas plantas. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade e o efeito anti-inflamatório dos extratos hidroalcoólicos de *T. argentea e A. colubrina* var. *colubrina in vitro* e *in vivo.* Empregando macrófagos da linhagem J774.1 mostramos que ambos os extratos nas concentrações de 31,25; 62,5; 125; 250; 500 ou 1000 μg/mL não são tóxicos. Além disso, empregando células J774.1 estimuladas com LPS antes ou depois da adição dos extratos (protocolo preventivo ou terapêutico) encontramos que os mesmos reduziram significativamente a produção de NO, IL-6, TNF-α e IL-1β, e aumentaram a de IL-10, por mecanismo dependente da inibição da ativação de NF-kB. Empregando camundongos da linhagem C57BL/6 e dois protocolos para avaliar toxicidade *in vivo, o* TG 423 (OECD, 2001) e o preconizado pela ANVISA (2013), encontramos que nas doses únicas de 300, 2000 e 5000 mg/kg, ou doses repetidas de 300 e 1000 mg/kg, nenhum dos extratos foi toxico para os animais. Quando avaliamos a atividade anti-inflamatória *in vivo*, empregando o modelo de bolha de ar inoculadas com LPS e tratadas localmente com os extratos nas doses de 5, 60 e 300 mg/kg, observamos que tanto o extrato hidroalcoólico de *T. argentea* como o de *A. colubrina var. colubrina,* na dose de 300 mg/kg, inibiram o extravasamento plasmático e a migração celular reduzindo a produção de citocinas inflamatórias e aumentando a produção de IL-10. Nossos dados nos permitem concluir que os extratos hidroalcoólicos de *T. argentea e A. colubrina var. colubrina* são anti-inflamatórios e apresentam potencial para serem empregados no desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios.

Palavras-chave: *Terminalia argentea, Anadenanthera colubrina,* inflamação, macrófagos, anti-inflamatórios.

ABSTRACT

MOREIRA, M. R. A. **Evaluation of the anti-inflammatory activities of the extracts of *Terminalia argentea* Mart. & Succ and *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina* (Benth.) Brenan**. 2017. 72p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017**.**

Medicinal plants are an important source for the discovery of new drugs. The *Terminalia argentea* Mart. & Succ and the *Anadenanthera colubrina var. colubrina* (Benth.) Brenan, commonly kwon as *capitao do campo* and *angico vermelho,* are used in the traditional medicine for the treatment of inflammatory diseases of the respiratory tract. However, very little is known about the chemical constitution and biological activity of these plants. This study evaluated the toxicity and the anti-inflammatory effect of the hydroalcoholic extracts of *T. argentea* and *A. colubrina* var. *colubrina in vitro* and *in vivo.* Using macrophages of the cell line J774.1 it was shown that both extracts in the concentrations of 31,25; 62,5; 125; 250; 500 or 1000 μg/mL are not toxic. Moreover, by using J774.1cells stimulated by LPS before or after the addition of the extracts (preventive or therapeutic protocol) it was detected that both reduced significantly the production of NO, IL-6, TNF-α and IL-1β, but increased the one of IL-10 by a mechanism dependent on the inhibition of the activation of NF-kB. While using C57BL/6 mice and two protocols to evaluate the *in vivo* toxicity, the TG 423 (OECD, 2001) and the one recommended by ANVISA (2013), it was found that neither in the single doses of 300, 2000 or 5000 mg/kg, nor in the repeated doses of 300 or 1000 mg/kg the extracts were toxic *in vivo*. When the anti-inflammatory activity is evaluated *in vivo* by using the inoculated by LPS air bubble model and treated locally with the extracts in the doses of 5, 60 or 300 mg/kg it was possible to observe that both, the hydroalcoholic extract of *T. argentea* and the *A. colubrina var. colubrina* in the dose of 300 mg/kg, inhibited plasma extravasation and cell migration by reducing the production of inflammatory cytokines and increasing the production of IL-10. These data allow the conclusion that the hydroalcoholic extracts of *T. argentea and A. colubrina var. colubrine* are anti-inflammatory and have potential to be used in the production of new anti-inflammatory medicines.

Key-words: *Terminalia argentea, Anadenanthera colubrina,* inflammation, macrophages, anti-inflammatory.

RESUMEN

MOREIRA, M. R. A. **Evaluación de la actividad anti-inflamatoria de los extractos de *Terminalia argentea* Mart. Y Succ y *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina* (Benth.) Brenan.** 2017. 72f. Dissertación (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Las plantas medicinales constituyen una importante fuente para el descubrimiento de nuevos fármacos. *Terminalia argentea* Mart. & Succ y la *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina* (Benth.) Brenan, popularmente conocidas como capitão do campo y angico vermelho respectivamente, se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del tracto respiratorio. Sin embargo, muy poco se conoce sobre la constitución química y la actividad biológica de estas plantas. El principal objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad y el efecto anti-inflamatorio de los extractos hidroalcoólicos de T. argentea y A. colubrina var. colubrina in vitro e in vivo. Utilizando macrófagos J774.1 mostramos que ambos extractos en las concentraciones de 31,25; 62,5; 125; 250; 500 o 1000 μg/mL no son tóxicos. Además, empleando células J774.1 estimuladas con LPS antes o después de la adición de los extractos (protocolo preventivo o terapéutico) encontramos que los mismos redujeron significativamente la producción de NO, IL-6, TNF-α e IL-1β, y aumentaron la de IL-10, por mecanismo dependiente de la inhibición de la activación de NF-kB. En el caso de los ratones del linaje C57BL/6 y dos protocolos para evaluar la toxicidad *in vivo*, el TG 423 (OECD, 2001) y el preconizado por la ANVISA (2013), encontramos que en las dosis únicas de 300, 2000 y 5000 mg/kg, o dosis repetidas de 300 y 1000 mg/kg, ninguno de los extractos fue tóxico para los animales. Cuando evaluamos la actividad antiinflamatoria in vivo, empleando el modelo de burbujas de aire inoculadas con LPS y tratadas localmente con los extractos a las dosis de 5, 60 y 300 mg/kg, observamos que tanto el extracto hidroalcoólico de *T. argentea* como el de *A. colubrina* var. *colubrina*, a la dosis de 300 mg/kg, inhibieron la extravasación plasmática y la migración celular reduciendo la producción de citocinas inflamatorias y aumentando la producción de IL-10. Nuestros datos nos permiten concluir que los extractos hidroalcoólicos de T. argentea y A. colubrina var. colubrina son anti-inflamatorios y presentan potencial para ser empleados en el desarrollo de nuevos fármacos antiinflamatorios.

Palabras clave: *Terminalia argentea*, *Anadenanthera colubrina*, inflamación, macrófagos, anti-inflamatorias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma dos protocolos utilizados para avaliação da atividade antiinflamatória..... 16

Figura 2. O extrato hidroalcoólico de *T. argentea* não altera a viabilidade celular..... 24

Figura 3. Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* inibe a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS 25

Figura 4. Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* inibe a produção de IL-6, TNF-α e IL-1β, mas aumenta a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS (protocolo preventivo)..... 26

Figura 5. Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* inibe a produção de IL-6, TNF-α e IL-1β, mas aumenta a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS (protocolo terapêutico)..... 27

Figura 6. Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* inibe a ativação do fator de transcrição NF-kB por macrófagos induzidos com LPS..... 29

Figura 7. Dose única do extrato hidroalcoólico de *T. argentea* não aumentou significativamente a quantidade de AST e ALT no plasma de camundongos tratados..... 31

Figura 8. Dose única do extrato hidroalcoólico de *T. argentea* não alterou o recrutamento celular no sangue dos camundongos tratados 32

Figura 9. Dose única do extrato de T. argentea não alterou a estrutura microscópica dos órgãos..... 33

Figura 10. Doses repetidas do extrato hidroalcoólico de *T. argentea* não aumentou significativamente a quantidade de AST e ALT no plasma de camundongos tratados..... 34

Figura 11. Doses repetidas do extrato hidroalcoólico de *T. argentea* não alterou o recrutamento celular no sangue dos camundongos tratados..... 35

Figura 12. Doses repetidas do extrato de T. argentea não alterou a estrutura microscópica dos órgãos..... 36

Figura 13. O extrato hidroalcoólico de *T. argentea* não alterou o extravasamento plasmático induzido por LPS no modelo de inflamação na bolha..... 37

Figura 14. O extrato hidroalcoólico de *T. argentea* não alterou o recrutamento celular induzido por LPS no modelo de inflamação na bolha de ar..... 38

Figura 15. O extrato hidroalcoólico de *T. argentea a*lterou a concentração de citocinas nos camundongos que receberam estímulo de LPS..... 39

Figura 16. O extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* não altera a viabilidade celular..... 41

Figura 17. Extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* inibe a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS..... 42

Figura 18. Extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* inibe a produção de IL-6, TNF-α e IL-1β, mas aumenta a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS (protocolo preventivo)..... 43

Figura 19. Extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* inibe a produção de IL-6, TNF-α e IL-1β, mas aumenta a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS (protocolo terapêutico)..... 44

Figura 20. Extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* inibe a ativação do fator de transcrição NF-kB por macrófagos induzidos com LPS..... 46

Figura 21. Dose única do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* não aumentou significativamente a quantidade de AST e ALT no plasma de camundongos tratados..... 48

Figura 22. Dose única do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* não alterou o recrutamento celular no sangue dos camundongos tratados 48

Figura 23. Dose única do extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* não alterou a estrutura microscópica dos órgãos..... 49

Figura 24. Doses repetidas do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* não aumentou significativamente a quantidade de AST e ALT no plasma de camundongos tratados..... 51

Figura 25. Doses repetidas do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* não alterou o recrutamento celular no sangue dos camundongos tratados..... 52

Figura 26. Doses repetidas do extrato de A. colubrina var. colubrina não alterou a estrutura microscópica dos órgãos..... 53

Figura 27. O extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* não alterou o extravasamento plasmático induzido por LPS no modelo de inflamação na bolha..... 54

Figura 28. O extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* não alterou o recrutamento celular induzido por LPS no modelo de inflamação na bolha de ar..... 55

Figura 29. O extrato hidroalcoólico de *T. argentea* alterou a concentração de citocinas nos camundongos que receberam estímulo de LPS..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dose única do extrato de *T. argentea* não interferiu no ganho de peso e no consumo de alimento e água dos animais..... 30

Tabela 2 – Doses repetidas do extrato de *T. argentea* não interferiu no ganho de peso e no consumo de alimento e água dos animais..... 34

Tabela 3 – Dose única do extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* não interferiu no ganho de peso e no consumo de alimento e água dos animais..... 47

Tabela 4 – Doses repetidas do extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* não interferiu no ganho de peso e no consumo de alimento e água dos animais..... 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

12-LOX Lipoxigenase 12

15-LOX Lipoxigenase 15

5-LOX Lipoxigenase 5

AA Ácido Araquidônico

ANVISA Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

AP-1 proteína ativadora 1

CAM Moléculas de Adesão Celular

COX-1 Cicloxigenase 1

COX-2 Cicloxigenase 2

DAMP's Padrões Moleculares Associados a Danos

DMSO Dimetilsulfóxido

E-selectina Selectinas Expressas no Endotélio

FAINE's Fármacos Anti-inflamatórios Não Esteroidais

ICAM-1 Molécula de Adesão Intercelular

IFN-γ Intérferon Gama

IL- 4 Interleucina 4

IL-1 Interleucina 1

IL-10 Interleucina 10

IL-12 Interleucina 12

IL-13 Interleucina 13

IL-15 Interleucina 15

IL-1RA Interleucina 1 Receptor antagonista de IL-1

IL-23 Interleucina 23

IL-6 Interleucina 6

LFA-1 Moléculas de Adesão do Tipo Integrinas Expressas em Linfócitos

LPS Lipopolissacarídeo

L-selectina Selectina Expressa em Leucócitos

LT Leucotrieno

LTA4 Leucotrieno A4

LTB4 Leucotrieno B4

LTC4 Leucotrieno C4

LTD4 Leucotrieno D4

LTE4 Leucotrieno E4

LX Lipoxina

M1 Macrófago do Tipo 1

M2 Macrófago do Tipo 2

Mac-1 e 3 Moléculas de Adesão do Tipo Integrinas Expressas em macrófagos

MAPK Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos

NF-kB Fator Nucler kappa B

NLR's Proteína de Oligomerização do Domínio de Ligação a Nucleotídeos

NO Óxido nítrico

IL-1β Interleucina 1Beta

PAF Fator Ativador de Plaquetas

PAMP's Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBS Tampão Fosfato-Salino

PECAM-1 Molécula de Adesão de Células Endoteliais Plaquetárias-1

PG Prostaglandina

PGD2 Prostaglandina D2

PGE_2 Prostaglandina E_2

PGF2α Prostaglandina F2 alfa

PGI_2 Prostaglandina I_2

PLA2 Fosfolipase A2

PRR Receptores de Reconhecimento de Padrões

OECD Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico

P-selectina Selectinas Expressas em Plaquetas

ROS Espécies Reativas de Oxigênio

TGF-β Fator de Transformação do Crescimento Beta

TLR's Receptores Semelhantes ao *Toll*

TNF-α Fator de Necrose Tumoral Alfa

TXA4 Tromboxano A4

VCAM-1 Molécula de Adesão Vascular

VLA-4 do inglês Very Late Antigen-4 superfamília das imunoglobulinas

LISTA DE SÍMBOLOS

α Alfa

β Beta

γ gama

g grama

kg quilograma

μL microlitro

μg micrograma

mg miligrama

mL mililitro

L litro

SUMÁRIO

Resumo..... **i**

Abstract..... **ii**

Resumén..... **iii**

Lista de figuras..... **iv**

Lista de tabelas..... **vii**

Lista de abreviaturas e siglas..... **viii**

Lista de símbolos..... **x**

1. INTRODUÇÃO..... 01

1.1 Inflamação..... 01

1.2 Plantas medicinais..... 05

2. JUSTIFICATIVA..... 09

3. OBJETIVOS..... 12

3.1 Estratégias para atingir nossos objetivos..... 12

4. MATERIAL E MÉTODOS..... 15

4.1 Coleta do vegetal e preparação dos extratos hidroalcoólicos..... 15

4.2 Ensaios *in vitro*..... 15

4.2.1 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* pela técnica de redução do brometo de tiazolil – 3 – (4,5- dimetiltiazol- 2- il)- 2,5- difeniltetrazólio (MTT)..... 16

4.2.2 *Design* experimental *in vitro*..... 16

4.2.3 Ensaio do NF-kB repórter..... 18

4.3 Ensaios *in vivo*..... 19

4.3.1 Animais..... 19

4.3.2 Determinação da toxicidade de dose única dos extratos de *T. argentea* ou *A. colubrina* var. *colubrina*..... 20

4.3.3 Determinação da toxicidade de doses repetidas dos extratos de *T. argentea* ou *A. colubrina* var. *colubrina*..... 21

4.3.4 Indução da reação inflamatória no tecido subcutâneo dorsal (*air pouch*) pela injeção de LPS e tratamentos com os extratos de *T. argentea* ou *A. colubrina* var. *colubrina*..... 21

4.3.4.1 Contagem total e diferencial de leucócitos..... 21

4.3.4.2 Determinação da concentração de proteínas nos lavados..... 22

4.3.5 Quantificação de óxido nítrico..... 22

4.3.6 Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático..... 23

5. RESULTADOS..... 24

5.1 Parte I..... 24

5.1.1 Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* não é citotóxico para macrófagos peritoneais da linhagem J774.1..... 24

5.1.2 Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* inibe a liberação de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS..... 25

5.1.3 Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* modifica a liberação de citocinas por macrófagos estimulados com LPS..... 26

5.1.4 Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* inibe a ativação do fator de transcrição NF-kB..... 29

5.1.5 Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* em dose única não é tóxico..... 31

5.1.6 Doses repetidas do extrato hidroalcoólico de *T. argentea* não induzem efeitos tóxicos..... 34

5.1.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *T. argentea* 37

5.2 Parte II..... 40

5.2.1 Extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* não é citotóxico para macrófagos peritoneais da linhagem J774.1..... 40

5.2.2 Extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* inibe a liberação de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS..... 41

5.2.3 Extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* modifica a liberação de citocinas por macrófagos estimulados com LPS..... 43

5.1.4 Extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* inibe a ativação do fator de transcrição NF-kB..... 45

5.1.5 Extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* em dose única não é tóxico..... 46

5.1.6 Doses repetidas do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* não induzem efeitos tóxicos..... 50

5.1.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* 54

6. DISCUSSÃO..... 59

7. CONCLUSÃO..... 64

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 66

9. ANEXOS..... 76

“O melhor sempre acontece e tudo aquilo que almejamos está totalmente ao nosso alcance.”
Celta

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A inflamação é um processo fisiopatológico que pode ser reversível ou irreversível, agudo ou crônico ou ainda órgão específico como na asma (VANE & BOTTING, 1987). A inflamação pode ser desencadeada por vários estímulos não específicos (agentes infecciosos, químicos e físicos) ou específicos (interação antígeno-anticorpo e resposta imune). Eventos característicos acontecem nos tecidos vascularizados e são responsáveis pelos sinais clássicos da inflamação: rubor, calor, dor, tumor e perda de função (VANE & BOTTING, 1998; GILROY *et al*., 2004). Assim a reação inflamatória pode ser definida como uma resposta da microcirculação a um estímulo, resultando no extravasamento de fluídos e formação do edema, e no recrutamento de leucócitos. Estes eventos são desencadeados por diferentes mediadores que se originam do plasma ou de células locais, e que podem ser ampliados ou modificados por produtos liberados de leucócitos que migraram para o local da inflamação. Os principais mediadores envolvidos nas alterações vasculares podem ser de origem celular como histamina, prostaglandinas (PGs) E_2 e I_2 (PGE_2 e PGI_2), leucotrienos (LT), fator ativador de plaquetas (PAF), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), quimiocinas e óxido nítrico (NO), ou derivados diretamente do plasma, como a bradicinina, proteínas do complemento (ex. C3a, C5a), fatores do sistema de coagulação e/ou sistema fibrinolítico (GILROY *et al.,* 2004; NEWTON & DIXIT, 2012; BUCKLEY *et al.*, 2013).

As PGs, LTs e lipoxinas (LXs) são derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA), e denominados conjuntamente como eicosanoides. O AA é um ácido graxo poli-insaturado, esterificado nos fosfolipídios que compõe a membrana celular. O AA é liberado dos fosfolipídios da membrana celular por ação principalmente da enzima fosfolipase A2 (PLA2) que é ativada por diversos estímulos químicos, físicos e mecânicos ou por outros mediadores (p. ex. C5a). Uma vez liberado o AA é metabolizado por três principais vias enzimáticas, a via das cicloxigenases (COX-1 e COX-2), a via das lipoxigenases (5-LOX, 12-LOX e 15-LOX) e a da via da P450 epoxigenase. Os produtos da via das COX são as PGE_2, PGD_2, $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 e tromboxano A_2 (TXA_4), enquanto os produtos da via das LOX,

como da 5-LOX a são os LTA_4, LTB_4, LTC_4, LTD_4 e LXs. Como mencionado acima, as PGs podem ser metabolizadas por duas isoformas enzimáticas, a COX-1 e COX-2 (PETERS-GOLDEN & BROCK, 2000). A COX-1 é expressa constitutivamente em vários tecidos e contribui para a manutenção de algumas funções fisiológicas. A COX-2 (induzível) tem sua expressão altamente aumentada em resposta aos estímulos inflamatórios (citocinas e patógenos). Os eicosanoides afetam vários eventos na microcirculação, incluindo coagulação, fibrinólise, reatividade e controle do fluxo sanguíneo vascular, permeabilidade vascular, adesão e migração leucocitária, controle local das funções das células do sistema imunológico. Por exemplo, as PGE_2 e PGI_2 induzem vasodilatação, potencializam o aumento da permeabilidade vascular e os efeitos quimiotáticos de outros mediadores. A PGE_2 induz febre e dor nos processos inflamatórios e infecciosos (CREMINON *et al.*, 1995; VANE & BOTTING, 1995; YI *et al.,* 2016). Os LTC_4, LTD_4 e LTE_4 induzem vasoconstrição e aumento da permeabilidade vascular em regiões venulares (FUNK, 2005) e recrutam eosinófilos (FACCIOLI, *et al.*, 1991). O LTB_4 é um potente mediador quimiotático promovendo adesão e migração de leucócitos (GOETZL & PICKETT, 1981; FACCIOLI *et al.*, 1991), aumentam a fagocitose e a morte de microorganismos (MANCUSO *et al.,* 1998), regulam a produção de IL-1β e o edema pulmonar (ZOCCAL *et al.,* 2016). O TXA_4 induz vasoconstrição e promoção da agregação plaquetária (GERRISTEN, 1996). As LXs foram os primeiros mediadores químicos reconhecidos que apresentam ação anti-inflamatória e atuam como agonistas em receptores específicos para regular respostas celulares que contribuem para resolução da inflamação (RAMSTEDT *et al.*, 1985; SERHAN *et al.*, 2015). As LXs estimulam a quimiotaxia e aderência dos monócitos sem causar desgranulação ou liberação de espécies reativas de oxigénio (ROS) (WU *et al.,* 2012), contribuindo para a recuperação do tecido lesado (PERRETTI *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003).

Os mediadores inflamatórios que coordenam a resposta inflamatória podem ser induzidos por sinais oriundos da interação entre agentes indutores e receptores específicos presentes na superfície celular. Estes receptores especializados da resposta imune inata são conjuntamente chamados de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (ou PRRs) e os mesmos reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (MOLLER, *et al.,* 2005),

padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (ZHENG *et al.*, 2013), padrões moleculares associados a venenos ou toxinas (VAMPs) (ZOCCAL *et al.*, 2014), entre outros. Como resultado ocorre à produção de um conjunto específico de mediadores que por sua vez, alteram os estados funcionais dos tecidos, de forma a permitir a adaptação do hospedeiro à presença do agente agressor (MEDZHITOV, 2007). Nas infecções bacterianas, por exemplo, o reconhecimento de patógenos pelos receptores do sistema imune inato, tais como receptores semelhantes ao *Toll* (toll-like receptors ou TLRs) e receptores *NOD-like* (proteína de oligomerização do domínio de ligação a nucleotídeos) (NLRs) desencadeia uma resposta específica, mediada por macrófagos e mastócitos residentes nos tecidos, levando à produção de quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e derivados de cascatas proteolíticas (FITZGERALD & O'NEILL, 2000; FRITZ *et al.,* 2006; MATHEWS *et al.*, 2008; CLAES *et al.*, 2015). O efeito principal e imediato destes mediadores é provocar um exsudado inflamatório no local, contendo proteínas do plasma e leucócitos (CLAES *et al.,* 2015). Quando no local da inflamação, os neutrófilos e macrófagos recrutados são ativados, quer por contato direto com os agentes patogênicos ou através do estímulo de citocinas secretadas por células residentes, liberam espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), espécies reativas de nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase ou ainda, mais citocinas, além de fagocitarem (e matarem o agente agressor, no caso de microrganismos) (MANTOVANI *et al.,* 2004; EDWARDS *et al.*, 2006; WU, 2012; YAMAMOTO *et al.,* 2012).

O recrutamento de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos para o foco inflamatório é um fenômeno complexo que depende da natureza do estímulo, dos mediadores quimiotáticos liberados e da expressão de moléculas de adesão (SPERTINI, 1996; ARCANGELI *et al.*, 2013). As moléculas de adesão celular (CAM) são glicoproteínas expressas na membrana celular, e medeiam o contato entre duas células ou entre células e a matriz extracelular e têm participação essencial na regulação da inflamação e resposta imune, (BUTCHER, 1991; LEY, *et al.*, 2007). A expressão de moléculas de adesão celular é regulada por uma série de fatores, incluindo citocinas inflamatórias (TNF-α, IL-1β), e estimulação de receptores de semelhantes ao *Toll* em macrófagos, fibroblastos e células dendríticas. Além disso, a expressão do gene VCAM-1 é regulada pelo fator de transcrição NF-kB, que pode

ser ativado pelo TNF-α e espécies reativas de oxigênio (PEPINSKY *et al.,* 1992; HARLING *et al.*, 2017). A migração de leucócitos ocorre através de interações específicas com o endotélio vascular, sendo o rolamento, a adesão e a transmigração mediados por: 1) moléculas de adesão do tipo selectinas expressas em plaquetas (P-selectina), em leucócitos (L-selectina) e no endotélio (E-selectina); 2) moléculas de adesão do tipo integrinas expressas em linfócitos (LFA-1) e em macrófagos (Mac-1 e 3); a molécula de adesão de células endoteliais plaquetárias-1 (PECAM-1) controla a localização de proteínas juncionais tais como VE-caderina e β-catenina e medeia o extravasamento de leucócitos nos locais de inflamação e a superfamília das imunoglobulinas (VLA-4), molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula de adesão vascular (VCAM-1) (ARCANGELI *et al.*, 2013; VESTWEBER, 2015; CHISTIAKOV *et al.*, 2016). As citocinas e outros mediadores inflamatórios influenciam no número e na expressão das CAM (MCEVER, 2015), e assim regulam o recrutamento celular. Os macrófagos desempenham papel essencial na regulação do processo inflamatório em várias condições fisiológicas e patológicas (MANTOVANI *et al.*, 2004). Os macrófagos são fenotipicamente heterogêneos, tendo diversas funções em diferentes tecidos (EDWARDS *et al.*, 2006). Estudos demonstram que a interação de macrófagos com citocinas específicas pode determinar seu fenótipo funcional (LIAMINA *et al*., 2012), enquanto outros descrevem que os macrófagos podem ser continuamente alterados à medida que o ambiente muda (STOUT & SUTTLES, 2004; PORCHERAY *et al.,* 2005; YU *et al.*, 2016).

Os macrófagos desempenham papel importante nas funções imunológicas, pois participam de diferentes mecanismos patológicos e homeostáticos. De acordo com o estado de ativação, os macrófagos podem ser referidos como Tipo I (M1 ou ativados pela via clássica) e Tipo II (M2 ou ativados pela via alternativa) (MANTOVANI *et al*., 2002). A ativação de M1 se dá em resposta ao LPS e IFN-γ e é caracterizado pela produção de IL-12, IL-23 (SICA & MANTOVANI, 2012) e pela alta capacidade de apresentar antígenos e produzir fatores, tais como quimiocinas CCL13 / MCP-4, CCL8 / MCP-2 e CCL26 / eotaxina-3 que coordenam o recrutamento de eosinófilos, basófilos e algumas células Th2 polarizadas (SICA & MANTOVANI, 2012).

Os macrófagos M1 são células efetoras potentes que combatem microorganismos, apresentam antígenos e produzem grande quantidade de NO, espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF-α, IL-6 e IL-1β (MOSSER, 2003; BIWAS & MANTOVANI, 2010). A ativação de M2 ocorre após a exposição a hormônios glicocorticoides e interleucinas como IL-4, IL-10 e IL-13. Estas células produzem fatores que suprimem a proliferação e ativação de células T e são adaptadas à eliminação de restos celulares, reparação e remodelação de tecidos lesados (MOSSER & EDWARDS, 2008; BIWAS & MANTOVANI, 2010; NORRIS & DENIS, 2014). Substâncias como o lipopolissacarídeo (LPS), um componente estrutural da parede de bactérias gram-negativas podem ativar macrófagos (MIZUGUCHI *et al.*, 1982). Após o estímulo com LPS, os macrófagos produzem mediadores inflamatórios via ativação de várias vias de sinalização intracelular, incluindo a via do fator nuclear-kB (NF-kB) e a via da *proteína ativadora 1* (AP-1). O NF-kB e AP-1 são fatores de transcrição que se translocam para o núcleo e induzem a expressão de genes inflamatórios, importantes para a produção de mediadores pró- inflamatórios como IL-1β e IL-6, TNF-a, PGE_2, ROS, e NO (RENIER *et al.,* 1994; HAYDEN & GHOSH, 2004). Assim, mediadores liberados de macrófagos são essenciais para indução, regulação e inibição da resposta inflamatória (MANTOVANI *et al.*, 2004), e contribuem para ativação celular autócrina, parácrina e/ou endócrina, promovendo e ativando suas funções efetoras, como fagocitose e atividade microbicida (EDWARDS *et al.*, 2006).

1.2 Plantas medicinais

O uso de plantas medicinais é uma prática desenvolvida pelo homem há milênios, para o tratamento, cura e/ou prevenção de diversas enfermidades. A maior fonte sobre plantas medicinais é o uso popular, sendo importante para a busca daquelas com potencial atividade terapêutica (VANE & BOTTING, 2003; CALIXTO, 2005). O conhecimento do uso tradicional de plantas contribuiu, e tem contribuído, para o desenvolvimento de fármacos utilizados na medicina, e o uso de produtos naturais é certamente uma das estratégias mais bem sucedidas para a descoberta de novos fármacos (GILROY *et al.*, 2004; CALIXTO, 2005).

As plantas medicinais são freqüentemente utilizadas com o intuito de substituir, ou auxiliar, as terapias convencionais para o tratamento de várias doenças. No entanto, inúmeras plantas usadas em preparações fitoterápicas necessitam de maior controle de qualidade, visto que a literatura científica indica que muitas destas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (CAPASSO *et al*., 2000; CALIXTO, 2005). Portanto, o controle rigoroso na identificação da espécie vegetal, na observação de fatores ambientais, época de colheita, parte da planta usada, método de secagem e armazenamento são essenciais para assegurar a qualidade de um medicamento fitoterápico (CALIXTO, 2005).

A diversidade química das plantas permite o isolamento de metabólitos farmacologicamente relevantes, sendo que muitos fármacos foram desenvolvidos, direta ou indiretamente destas fontes naturais, especialmente para o tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas, para o alivio da dor, do edema e da febre (CELOTTI & LAUFER, 2001; BARNES *et al.,* 1998; AKKOL *et al.*, 2012). Embora os medicamentos derivados de plantas sejam muito utilizados pela população, são poucos os dados científicos que comprovam a eficácia e o espectro toxicológico destes medicamentos (CALIXTO *et al.*, 2001). Considerando os diversos metabólitos secundários presentes nas plantas, as principais categorias são os terpenóides, glicosídeos, alcalóides e outros. Como exemplos relevantes de medicamentos obtidos de plantas, podemos mencionar a morfina (*Papaver somniferum*), a digoxina (*Digitalis lanata*), o taxol (*Taxus brevifolia*), a vincristina e a vimblastina (*Catharanthus roseus*), dentre outros (RATES, 2001). Estudos em laboratório também identificaram o ácido elágico, presente na *Lafoensa pacari,* que é uma árvore do cerrado brasileiro, como o composto responsável pela ações anti-inflamatória, analgésica e anti-edematogênica (ROGERIO *et al.*, 2006).

Entre os fármacos anti-inflamatórios estão aqueles não esteroidais (FAINES) e os esteroidais como os glicocorticoides, que são os principais medicamentos antiflogísticos conhecidos. Os glicocorticoides são muito usados para a supressão da inflamação nas doenças inflamatórias crônicas (BARNES *et al.* ,1998), sendo os FAINEs mais utilizados como antipirético e analgésico, por inibirem as enzimas COX-1 e COX-2 (MARNETT, 2009). Os FAINES formam um grupo heterogêneo de compostos quimicamente não relacionados, mas com efeitos terapêuticos similares:

anti-inflamatório, antipirético e analgésico (VANE & BOTTING, 1998; SOUSA, *et al*, 2013). O mecanismo de ação dos glicocorticoides é de amplo espectro, pois inibem genes que codificam citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas e enzimas (BARNES *et al.*, 2008). Os glicocorticoides inibem a ativação de NF-κB através do aumento de IκBα, que se adere ao NF-κB reduzindo a atividade inflamatória dos genes responsáveis pela produção da COX-2 e das moléculas de adesão intercelular (WISSINK *et al.*, 1998). No entanto, ambas as categorias de anti-inflamatórios apresentam efeitos colaterais, que podem limitar o uso dos mesmos por grande parte da população. Entre os efeitos adversos dos FAINEs estão aqueles no trato gastrintestinal, nos rins, na coagulação, e indução de hipersensibilidade dentre outros (CELOTTI & LAUFER, 2001), e entre os glicocorticoides está a mimetização da ação de hormônios corticosteróides provocando danos em vários os tecidos (DOSTERT & HEINZEL, 2004), desequilíbrio eletrolítico, gerando quadros de hipocalemia, edema e hipertensão (ADACHI *et al.,* 1993), alterações de humor que podem levar a quadros de depressão (GILLIN *et al*., 1972), sendo que o seu uso contínuo, em casos de doenças crônicas, pode levar a hipoplasia da glândula adrenal (ANNANE, 2008). Desta forma, a procura de plantas medicinais com potencial atividade anti-inflamatória, e que não apresentem efeitos adversos relevantes, têm sido motivo de estudos em diferentes laboratórios em todo o mundo.

A *Terminalia argentea* Mart. & Succ., é uma arvore pertencente à família *Combretaceae*, conhecida popularmente com Capitão do Campo, Capitão-do-cerrado ou apenas Capitão. A mesma é nativa do cerrado brasileiro, mas pode também ser encontrada na Mata Atlântica (LORENZI *et al.*, 2002). O decocto da casca desta árvore é muito utilizado na medicina popular para o tratamento de doenças do trato respiratório (ex. tuberculose, pneumonias, bronquites) e cistites, além de formulação de xaropes expectorantes e tratamento de aftas bucais (GUARIM NETO, 2006). Sabe-se que representantes da família *Combretaceae* como a *T. arjuna* (HALDER *et al.*, 2009), a *T. paniculata* (TALWAR *et al.*, 2011), a *T. catappa* (YEH *et al.*, 2012) e a *T. chebula (REDDY et al.*, 2009) apresentam significativa atividade anti-inflamatória em modelos experimentais de inflamação *in vivo*. Estudos fitoquímicos do extrato etanólico da casca de *T. argentea* comprovaram a ocorrência de triterpenos pentacíclicos, flavonas e lignanas

(GARCEZ *et al.*, 2003). No entanto, embora muito utilizada na medicina popular, o mecanismo de ação e a toxicidade da *T. argentea* ainda não foram estudados.

Outro importante alvo de estudos são as espécies da família *Fabaceae*. A investigação das propriedades terapêuticas de espécies desta família tem demonstrado que extratos hidroalcoólico de espécies do gênero *Anadenanthera* apresentam atividades antibiótica (FIGUEREDO *et al.*, 2013; BARRETO *et al.*, 2016), anti-inflamatória (GUTIERREZ-LUGO *et al.*, 2004) e antinociceptiva (SANTOS *et al.*, 2013). O gênero *Anadenanthera* é composto por duas espécies, a *Anadenanthera peregrina* e *Anadenanthera colubrina*. Cada uma dessas espécies pode ser dividida em duas variedades de indivíduos. Estas variedades são distinguidas por um conjunto de caracteres morfológicos correlacionados com uma distribuição geográfica específica. A espécie *Anadenanthera peregrina*, apresenta as variedades *Anadenanthera peregrina peregrina* e *Anadenanthera peregrina falcatta* sendoque a espécie *Anadenanthera colubrina* é representada pelas variedades *Anadenanthera colubrina cebil* e *Anadenanthera colubrina colubrina* (ALTSCHUL, 1964).

A *Anadenanthera colubrina* (Benth.) Brenan var. *colubrina* popularmente conhecida como Angico Vermelho, é nativa da América Latina (LORENZI, 2002) e usada popularmente para a produção de xaropes para tosse e chás para o tratamento de doenças do trato respiratório. No entanto seu mecanismo de ação e atividade citotóxica nunca foram investigados.

“A vida é aquilo que você deseja diariamente.”

André Luiz

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A inflamação presente em infecções e em diversas doenças é um processo benéfico, mas que deve ser finamente regulado. Assim, em situações onde a inflamação resulta em desconforto ou em danos teciduais e perda de funções dos órgãos atingidos, faz-se necessário o uso de fármacos para seu controle. Atualmente, os anti-inflamatórios disponíveis no mercado, via de regra, apresentam efeitos colaterais relevantes, justificando assim a procura por novos fármacos mais eficientes e sem tais efeitos adversos. Por isto, plantas popularmente utilizadas para o tratamento da inflamação têm sido fontes importantes para a procura de novos fármacos. No entanto, pesquisas são necessárias para o esclarecimento e confirmação de informações sobre as ações benéficas e/ou tóxicas das plantas, visando a minimizar a ocorrência de efeitos colaterais e/ou toxicológicos, para que haja o uso confiável e seguro das mesmas.

Dentre as plantas utilizadas no Brasil para o preparo de extratos utilizados na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias estão a *T. argentea* e a *A. colubrina* var. *colubrina.* No entanto, pouco ou nenhum estudo existe sobre a citotoxicidade e a atividade anti-inflamatória destes extratos, justificando assim a realização de nossos estudos. Esperamos que nossos resultados possam dar suporte para o uso das plantas *T. argentea* e a *A. colubrina* var. *colubrina* tanto na fitoterapia quanto na produção de novos fármacos.

“A natureza não faz nada em vão.
Em todos os seus feitos existe algo de maravilhoso.”
Aristóteles

3. OBJETIVO

3. OBJETIVO

Avaliar a toxicidade e atividade anti-inflamatória dos extratos hidroalcoólicos da *T. argentea* e da *A. colubrina* var. *colubrina*.

Para tanto, realizamos estudos *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente empregando os extratos hidroalcoólicos da *T. argentea* ou da *A. colubrina* var. *colubrina*, avaliamos a citotoxicidade e regulação da produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos da linhagem J774.1 estimulados ou não com LPS, empregando dois protocolos diferentes, um denominado preventivo e outro terapêutico. Também investigamos se os extratos inibem a ativação do fator de transcrição NF-kB em células de linhagem RAW 264.7 estimuladas ou não com LPS. Em seguida determinamos a toxicidade aguda e a crônica *in vivo*. Para avaliar o potencial anti-inflamatório dos extratos empregamos o modelo de inflamação induzida pela inoculação de LPS na bolha de ar no dorso de camundongos tratados ou não intra-bolha, com doses dos extratos pré-determinadas nos ensaio de toxicidade.

3.1 Estratégias para atingir nossos objetivos

In vitro

Em macrófagos da linhagem J774.1 e RAW 264.7 incubados com diferentes concentrações dos extratos de *T. argentea* ou de *A. colubrina* var. *colubrina,* na presença ou ausência de LPS, em protocolo preventivo ou terapêutico, avaliamos:

- a citotoxicidade através do ensaio colorimétrico do MTT;
- a produção de citocinas utilizando kit comerciais, e NO pelo método de Greiss.
- a ativação ou inibição do fator de transcrição NF-kB utilizando macrófagos tranfectados da linhagem RAW 264.7 através do kit QUANTI-blue ;

In vivo

Em camundongos C57BL/6 inoculados com diferentes doses dos extratos de *T. argentea* ou de *A. colubrina* var. *colubrina*, avaliamos:

- A toxicidade aguda conforme protocolo preconizado pela OECD (TG 423). Nestes animais avaliamos toda e qualquer alteração de peso corporal, consumo de alimento e água, alteração de enzimas hepática (ALT/AST), recrutamento celular e histologia dos órgãos;
- A toxicidade crônica conforme protocolo preconizado pela ANVISA (*guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos*, 2013). Nestes animais avaliamos alteração de peso corporal, consumo de alimento e água, alteração de enzimas hepática (ALT/AST), recrutamento celular e histologia dos órgãos;
- A atividade anti-inflamatória dos extratos hidroalcoólicos empregando o ensaio de bolsa de ar no dorso dos animais, inoculada com LPS. Nos lavados das bolhas determinamos o recrutamento celular, alterações na concentração de proteínas e a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias.

“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então, com todo o coração, dedicar-se a ele”.

Buda

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta do vegetal e preparo dos extratos hidroalcoólicos

As amostras de *T. argentea e de A. colubrina var. colubrina* foram coletadas na cidade de Uberaba, estado de Minas Gerais, Brasil (Lat. -19.743623, Long -47.828514). As exsicatas foram analisadas e identificadas pelo Prof. Dr. Milton Groppo Junior e depositadas no herbário da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Os extratos foram obtidos a partir de 100 g de entrecasca seca e moída, dissolvida em 1 L de álcool de cereais a 70% (JT Baker, Belo Horizonte, Brasil) destilado. Foi utilizado frasco escuro acondicionado em temperatura ambiente durante 72 horas com agitações diárias, sendo posteriormente o extrato filtrado em papel filtro. O filtrado foi seco empregando rota-evaporador (Eppendorf Vacuum Concentrator Plus, Hamburgo, Alemanha). O extrato seco foi pesado e suspendido em 997 μL PBS (tampão fosfato-salino) e 3 μL de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), até se obter a concentração final de 1 g/mL. Este extrato foi filtrado e armazenado em freezer a -20° C em alíquotas de 500 μL.

4.2. Ensaios *in vitro*

4.2.1 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* pela técnica de redução do brometo de tiazolil - 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT)

Imediatamente antes do uso, os extratos contendo 1 g/mL de *T. argentea* ou *de A. colubrina var. colubrina* foram suspensos em meio de cultura DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) (DMEN- C) e gentamicina (1%). Concentrações de 3,5; 7; 15; 31,25; 62,5; 125; 250 μg/mL, foram empregadas *in vitro* para avaliar a toxicidade celular, produção de citocinas, nitrito e mediadores lipídicos. Uma suspensão de macrófagos J774.1, cultivados em DMEN- C, foi ajustada para 1 x 10^5 células/poço em 200 μL de meio de cultura DMEN com 10% de SBF e 1% de gentamicina. As células foram dispostas em microplaca de 96 poços

(Corning Inc., Corning, NY, USA) e incubadas a 37°C, 5% de CO_2 por 2 h para adesão. Após este período, o sobrenadante foi retirado e as células receberam meio de cultura contendo diferentes concentrações dos extratos de *T. argentea* ou *A. colubrina* (31, 25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 μg/mL). O controle negativo de morte celular foi feito somente com meio de cultura e o controle positivo com DMSO (que mata 100% das células). Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio RPMI (200 μL/poço) sem soro e sem vermelho de fenol, mas contendo o corante brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, Hamburgo, Alemanha) (MOSMANN, 1983). As células foram incubadas nas condições acima por 4 h. A absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro (mQuanti, Biotec Instruments, Inc. Winooski, VT).

4.2.2 *Design* experimental *in vitro*

Dois protocolos para avaliação da atividade anti-inflamatória, foram utilizados *in vitro* e denominados preventivo e terapêutico. No protocolo preventivo as células J774.1 (1 x 10^5 células/mL) foram semeadas em placa de 96 poços (Corning Inc., Corning, NY, USA) e 2 horas depois, foram pré- estimuladas com as concentrações 3,5; 7; 15; 31,25; 62,5; 125; 250 μg/mL dos extratos (100 μL/poço) e novamente incubadas a 37°C, 5% de CO_2 . Após 2 horas foi adicionado 100 μL/poço de meio contendo LPS (*Escherichia coli* 055: B5; Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído de modo a se obter a concentração de 0,5 μg/mL no poço. Após 22 horas da adição do LPS o sobrenadante foi coletado e guardado. No protocolo terapêutico as células foram pré- estimuladas com LPS (100 μL/poço de meio contendo 0,5 μg/mL) e após 2 horas receberam as diferentes concentrações acima dos extratos diluídos em 100 μL de meio/ poço. As células forma incubadas novamente, e após 22 horas da adição do LPS, o sobrenadante foi coletado e estocados. Os sobrenadantes foram armazenados em freezer a -20°C, para posterior quantificação de óxido nítrico, citocinas e mediadores lipídicos.

Abaixo estão os esquemas dos tratamentos.

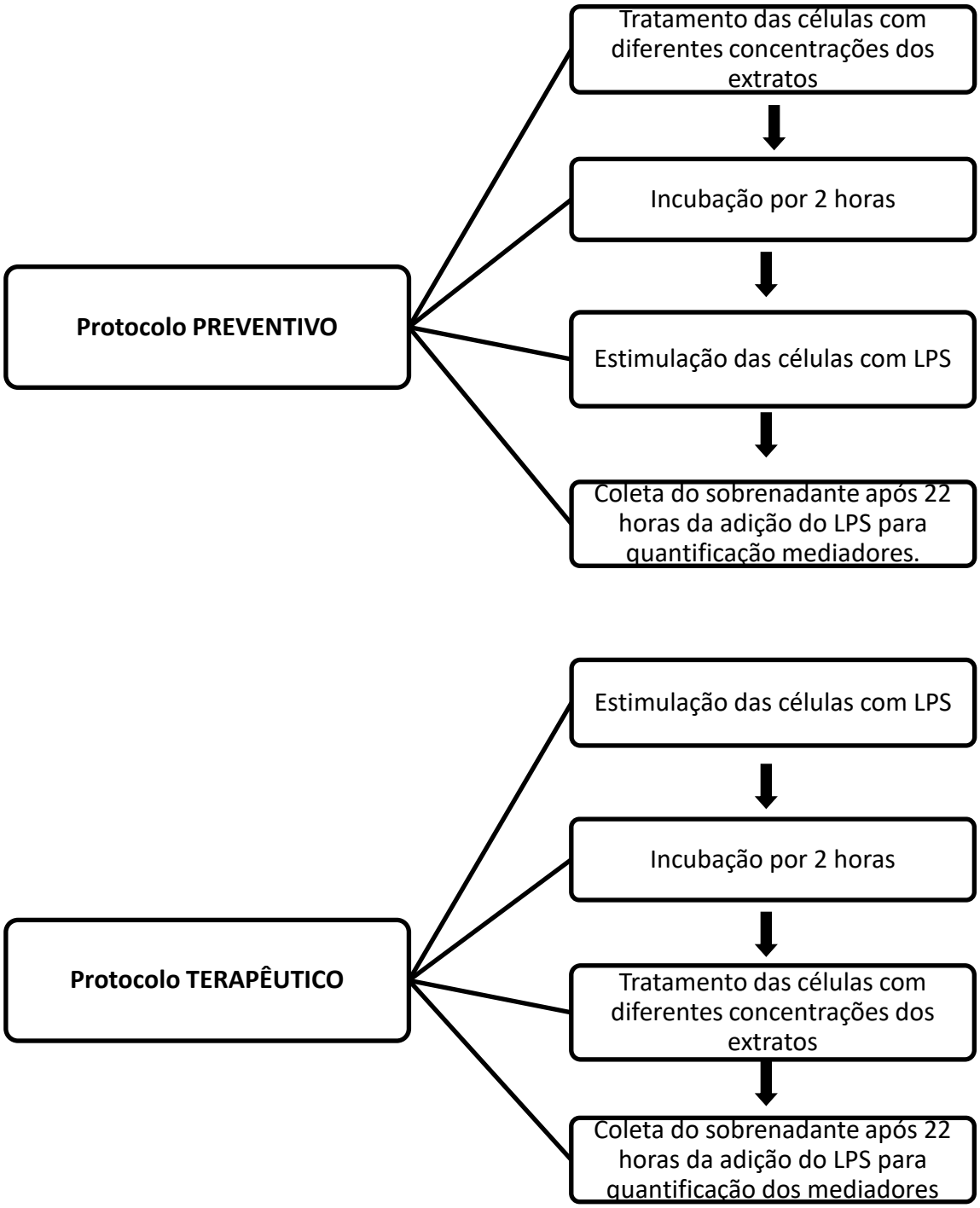


Figura 1. **Fluxograma dos protocolos utilizados para avaliação da atividade anti-inflamatória**. Os extratos foram diluídos em meio DMEN-C de modo a se obter diferentes concentrações. No protocolo preventivo as células J774.1 foram semeadas e tratadas por 2 horas com os extratos e em seguida estimuladas com LPS (0,5 μg/mL). Após 22 horas da adição do LPS, os sobrenadantes foram retirados e armazenados. No protocolo terapêutico, as células foram semeadas e estimuladas por 2 horas com LPS (0,5 μg/mL) e a seguir foram tratadas com as diferentes concentrações dos extratos. Após 22 horas da adição do LPS, os sobrenadantes das células foram retirados e armazenados. Os sobrenadantes foram utilizados para quantificação de mediadores.

4.2.3 Ensaio de NF-kB repórter

Macrófagos RAW 264.7, transfectados com gene repórter, que expressam de forma estável a fosfatase alcalina secretada embrionária (SEAP), induzida pelo fator de transcrição NF-kB/ AP-1, foram doados pelo Dr Huy Ong (Université de Montreal, Canadá). As células foram semeadas em placas de 96 poços, a uma densidade de 1 X 10^5 células/poço em DMEM suplementado com Normocin ™ (50 mg/mL) e cultivadas a 37°C e 5% de CO_2 durante 18 horas. Após este período, as células foram tratadas com os extratos nas concentrações de 3,5; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250 μg/mL em 100 μL de DMEN/poço. Após 2 h as células estimuladas com 100 μL de solução de LPS (0,5 μg/mL) (*Escherichia coli* 055: B5; Sigma, St. Louis, MO, USA). No protocolo terapêutico as células foram pré- estimuladas com LPS (100 μL/poço de solução 0,5 μg/mL) e após 2 horas receberam as diferentes concentrações dos extratos (100 μL/poço). Após 22 horas de incubação com o LPS, o meio foi coletado, e 50 μL de amostras foram transferidos para placas de 96 poços e 150 μL de quanti-BlueTM (InvivoGen), que é o meio de detecção de SEAP foram adicionados. As placas foram novamente incubadas a 37ºC durante 2 horas. A densidade óptica foi então lida a 650 nm utilizando leitor de ELISA (mQuanti, Biotec Instruments, Inc. Winooski, VT, USA).

4.3. Ensaios *in vivo*

4.3.1 Animais

Camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6 (16-27 g e com 6 a 10 semanas) foram obtidos do Biotério Convencional Unidade I da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), e mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso a comida e água. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), processo nº 15.1.861.60.6, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

4.3.2 Determinação da toxicidade de dose única dos extratos de *T. argentea* ou de *A. colubrina* var. *colubrina*

Para os estudos de toxicidade de dose única foram empregadas camundongas, adultas, nulíparas, conforme protocolo preconizado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), método de ensaio 423 (TG 423). Para tanto, os animais foram divididos em 3 grupos (de acordo com as doses) com 3 animais por grupo (n = 3/grupo) por extrato. No primeiro grupo, os animais foram tratados com 300 mg/kg dos extratos de *T. argentea* ou *A. colubrina* var. *colubrina* e observados por 30 minutos, 4 horas e 24 horas, e uma vez por dia por 14 dias. A partir dos resultados obtidos com o grupo 1, as doses de 2.000 mg/kg e 5.000 mg/kg foram empregadas utilizando o mesmo esquema. Os extratos foram diluídos em água e administrados por via oral (gavagem). Durante o período de observação foram registradas todas as ocorrências. A cada 2 dias foram avaliados e registrados o peso de cada animal, o consumo de água e de ração dos animais individualmente. Ao final, no 14° dia, os animais foram pesados e eutanasiados em câmara de gás carbônico. O fígado, baço e rins foram observados macroscopicamente, retirados, pesados e armazenados em formol tamponado para análises histológicas, após serem fixados em formaldeído 10%, por um período mínimo de 48 horas. Fragmentos dos órgãos foram processados de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, cortados em micrótomo em amostras de 3-4 micrômetros, as quais foram coradas pela técnica da Hematoxilina/Eosina (H.E.). Toda e qualquer alteração dos animais foram registradas. A análise macro e histopatológica dos órgãos foram avaliadas e o peso corporal e consumo de alimento e água foram organizados em uma tabela (Tabela 1).

4.3.3 Determinação da toxicidade de doses repetidas dos extratos de *T. argentea ou A. colubrina* var. *colubrina*

Os camundongos da linhagem C57BL/6, pesando entre 16 e 27 g (6/ 10 semanas), foram divididos em macho e fêmea. Estes grupos foram subdivididos em um grupo que recebeu a dose de 300 mg/kg e outro a dose de 1000 mg/kg. Animais

macho e fêmea, que receberem água filtrada via oral, foram utilizados como controles conforme recomendação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013). Os animais receberam extratos ou água durante os 14 dias, sendo os mesmos administrados duas vezes ao dia (12 em 12 horas). Diariamente foi feita avaliação macroscópica com observação de modificações dos seguintes parâmetros: textura da pele e dos pelos; secreções nos olhos e mucosas; alterações na respiração, no sistema motor, no tônus muscular e no sistema nervoso central (tremores, convulsão e sedação) e no sistema nervoso autônomo (lacrimejamento, salivação) (ANVISA, 2013). No final do período dos tratamentos, os camundongos foram eutanasiados em câmara de gás carbônico e imediatamente depois, realizada punção cardíaca para a coleta de sangue, em tubos heparinizados. O sangue foi destinado para as determinações bioquímicas de aspartato aminotransfersase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e contagem total e diferencial de células. A contagem global de leucócitos foi realizada em utilizando solução de Turk e câmara de Neubauer, e a diferencial em esfregaço realizado em centrifuga citológica (Citospin modelo 2400, Fanem, São Paulo) e coradas pelo corante Panótico (Laborclin, Paraná, Brasil). Fígado, rins e baço foram retirados, fixados em formaldeído 10%, por um período mínimo de 48 horas, e processados por técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, cortados em micrótomo em fragmentos de 3-4 micrômetros, os quais foram corados pela técnica da Hematoxilina/Eosina (H.E.). Os órgãos descritos acima foram avaliados quanto à presença ou não de congestão, edema, hemorragia, degeneração ou necrose.

4.3.4 Indução da reação inflamatória no tecido subcutâneo dorsal (*air pouch*) pela injeção de LPS e tratamentos com os extratos de *T. argentea* ou *A. colubrina* var. *colubrina*

O modelo utilizado consiste na indução de bolsas de ar artificial no dorso dos animais, através da injeção subcutânea de ar estéril (GARCIA-RAMALLO *et al.*, 2002). Os camundongos foram previamente anestesiados com quetamina e xilasina (75 e 10 mg/kg respectivamente). As bolsas de ar foram induzidas na região dorsal por injeção subcutânea de 3 mL de ar esterilizado nos dias 0 e 3. No 6º dia, os

animais receberam na bolha (injeção subcutânea) o estímulo e tratamentos (5 animais/grupo) como segue:

1. controle negativo sem estímulo inflamatório: recebeu 1 mL de PBS e 1 hora depois mais 1 mL de PBS;

2. controle positivo inflamado: recebeu 1 mL solução de LPS na concentração de 0,5 µg/mL e 1 hora depois recebeu 1 mL de PBS;

3. e 3a: grupo somente extrato: recebeu 1 mL de solução contendo *T. argentea* ou *A. colubrina* var. *colubrina* na concentração de 300 mg/kg e 1 hora depois 1 mL de PBS;

4 e 4a. *grupo 1* inflamado e tratamento terapêutico: recebeu 1 mL de LPS (concentração de 0,5 µg/mL) e 1 hora depois 1 mL de solução dos extratos (*T. argentea* ou *A. colubrina)* na concentração de 5 mg/kg;

5. e 5a: *grupo 2* inflamado e tratamento terapêutico: recebeu 1 mL de LPS (concentração de 0,5 µg/mL) e 1 hora depois 1 mL de solução dos extratos (*T. argentea* ou *A. colubrina)* na concentração de 60 mg/kg;

6. e 6a. *grupo 3* inflamado tratamento terapêutico recebeu 1 mL de LPS (concentração de 0,5 µg/mL) e 1 hora depois 1 mL de solução dos extratos (*T. argentea* ou *A. colubrina)* na concentração de 300 mg/kg.

Após 4h da última injeção, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 e as bolsas lavadas com 2 mL de PBS heparinizado (10 UI/mL). Com o auxílio de uma pipeta os lavados foram coletados, através de uma incisão na bolsa. Os lavados foram utilizados para contagem total e diferencial de células, quantificação de proteínas e citocinas (FRONZA *et al.*, 2016).

4.3.4.1 Contagem total e diferencial de leucócitos

A contagem de células totais presentes nos lavados foi realizada empregando solução de Turk e câmara de Neubauer. As contagens diferenciais das células foram feitas a partir de lâminas preparadas em citocentrifuga e coradas por Panótico Rápido (Laborclin – Paraná, Brasil). Os valores foram expressos em número de células/mL (MEDEIROS *et al.*, 2004).

4.3.4.2 Determinação da concentração de proteínas nos lavados

Os lavados coletados da bolhas foram centrifugados a 1.000 *g* por 15 minutos a 4°C, e os sobrenadantes utilizados para quantificar proteínas, empregando reação de Bradford (BRADFORD, 1976). Em placa de 96 poços, foram adicionados 10 µL dos sobrenadantes e em cada poço 200 µL de reagente de Bradford. Apos, x min, a absorbância foi verificada em 595 nm. Os resultados foram interpolados a uma curva padrão de albumina sérica bovina, com concentrações variando de 50 a 300 ng/mL.

4.3.5 Quantificação de óxido nítrico

A quantidade de nitrito presente nos sobrenadantes obtidos no item 3.2.2 foi determinada como um indicador da produção de NO pelo método de Griess (GREEN *et al*., 1982). Da quantidade de nitrito (NO^2-) detectada nas amostras, utilizando diluições seriadas de $NaNO_2$, foi elaborada uma curva padrão. A absorbância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro (Bio-Tek Instruments, Inc. - Quant, Winooski, VT, USA).

4.3.6 Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os sobrenadantes obtidos como descrito no item 4.2.2 e os lavados das bolhas (item 4.3.4) foram utilizados para quantificar as citocinas IL-6, TNF-α, IL- 1β, IL- 10 pelo método de ELISA. Foram utilizados anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e proteínas recombinantes, de acordo com as instruções do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, EUA). A leitura de densidade óptica foi medida em 450 nm em leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc. - Quant, Winooski, VT) e a concentração de citocinas calculada a partir de curva padrão criada (expressos em pg / mL). A sensibilidade foi de 10 pg/mL.

“Na natureza nada se cria, nada se perde,
tudo se transforma.”

Antoine Lavoisier

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os mesmos experimentos foram realizados com os dois extratos objetos de estudo desta dissertação, e os resultados foram divididos em duas partes. **Parte I**: corresponde aos dados obtidos com o extrato hidroalcoólico de *T. argentea;* e **Parte II**: corresponde aos dados obtidos com extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina.*

5.1 PARTE I

5.1.1 Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* não é citotóxico para macrófagos peritoneais da linhagem J774.1

A citotoxicidade foi avaliada *in vitro* utilizando macrófagos peritoneais da linhagem J774.1, incubados com diferentes concentrações do extrato de *T. argentea*. Após semear as células, as mesmas foram tratadas com as concentrações 31; 25; 62,5; 125; 250; 500 ou 1000 μg/mL do extrato, seguido de incubação por 24 horas. Após período de incubação, os sobrenadantes foram retirados e as células receberam o corante brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Foi utilizado o MTT para avaliar a atividade das mitocôndrias das células, pois estas reduzem o sal de tetrazolium em formazan, um cristal azul solúvel que é produzido proporcionalmente à quantidade de células viáveis, e a absorbância foi determinada em espectofotômetro. Os resultados demonstraram que nenhuma das doses utilizadas do extrato foi toxica para as células J774.1. Utilizamos como controle positivo DMSO, que mata 100% das células quando em concentrações maiores que 3 μg/mL. Células com meio mais o veiculo diluente dos extratos foram usadas como controle negativo da citotoxicidade. A partir deste resultado escolhemos doses menores do que 1000 μg/mL para os demais experimentos *in vitro* com o extrato.

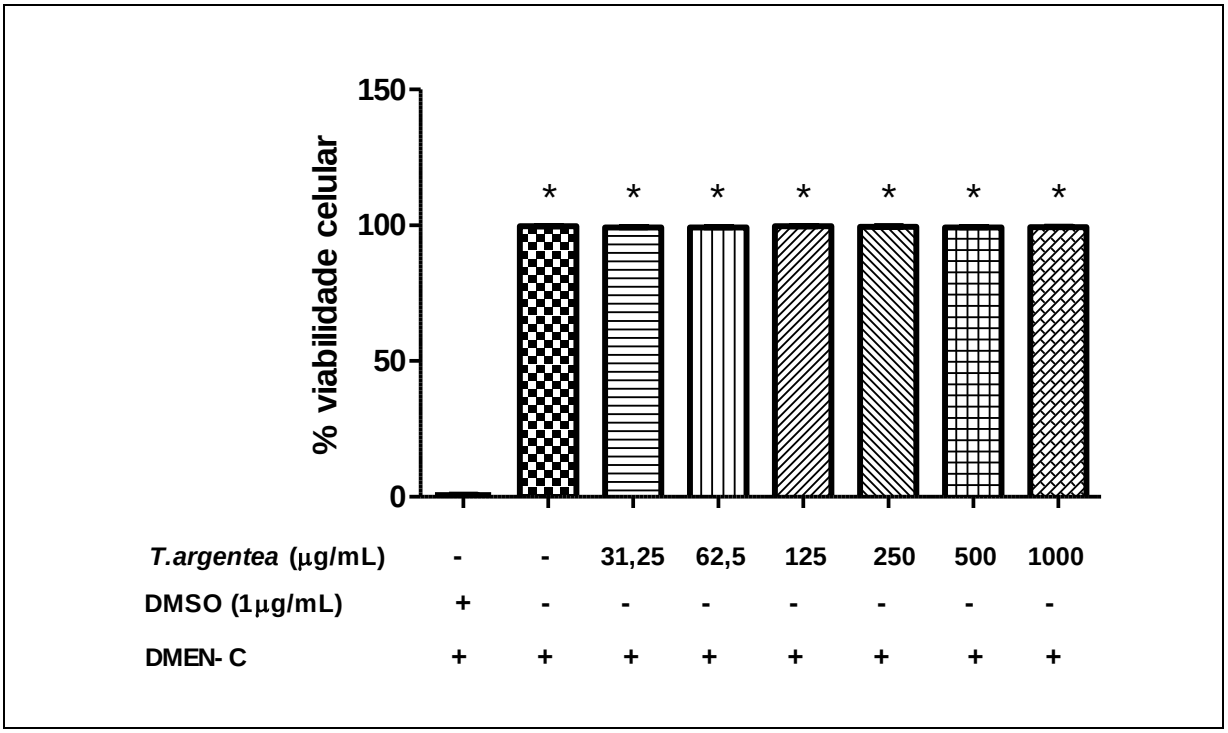


Figura 2. O extrato hidroalcoólico de *T. Argentea* não altera a viabilidade celular. As células J774.1 (n = 8) foram cultivadas em microplaca de 96 cavidades e incubadas por 2 horas para adesão. Após este período o meio de cultura foi substituído por meio DMEN-C contendo diferentes concentrações dos extratos de *T. argentea*. O controle negativo foi meio de cultura adicionado do veiculo diluente dos extratos (DMEN- C) e o controle positivo foi 3 µg/mL de DMSO. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Cada coluna representa a média de oito (n = 16) poços de dois experimentos independentes. A absorbância foi medida em 570 nm com espectrofotômetro. Diferenças consideradas estatisticamente significativas com $p < 0,05$, pelo teste One-Way- ANOVA *post hoc* Tukey. *DMSO *versus* extratos.

5.1.2 Extrato de hidroalcoólico *T. argentea* inibe a liberação de Óxido Nítrico por macrófagos estimulados com LPS.

A quantificação de óxido nítrico (NO) foi realizada no sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos (linhagem J774.1) estimulados com LPS e tratados ou não com diferentes concentrações do extrato, empregando dois protocolos, um preventivo e outro terapêutico. No protocolo preventivo (Figura 3A), as células foram tratadas com os extratos de *T. argentea* nas concentrações de 0,49; 1,96; 7,8; 31,25; e 125 µg/mL, e após 2 horas receberam LPS (0,5 µg/mL), um indutor da liberação de NO. No protocolo terapêutico (Figura 3B), os macrófagos foram estimulados com LPS (0,5 µg/mL) e após 2 horas de incubação receberam os extratos de *T. argentea* nas mesmas concentrações acima. Nossos resultados

mostraram que, quando comparado com a produção induzida pelo LPS apenas, e nos dois protocolos, todas as concentrações do extrato inibiram a produção de NO.

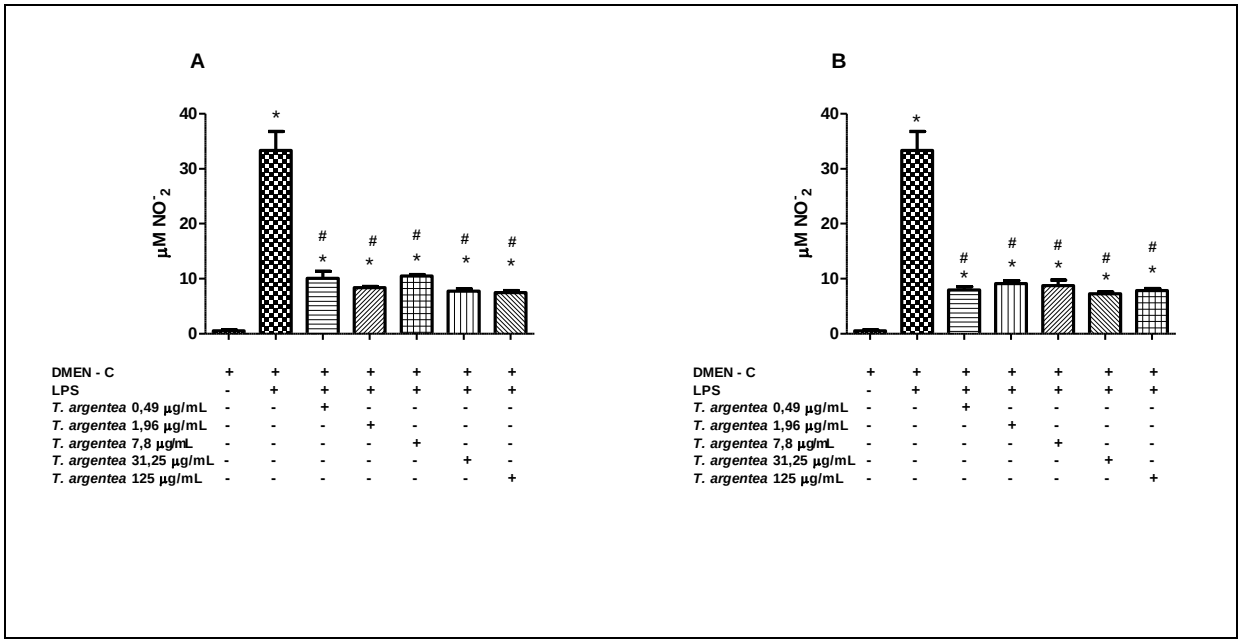


Figura 3. Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* inibe a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS. (A) Protocolo preventivo: Macrófagos da linhagem J774.1 (n = 8) cultivados em placa de 96 poços e pré-incubados ou não com diferentes concentrações do extrato de *T. argentea* por 2 horas e depois estimulados com LPS (0,5 µg/mL) por 22 horas. (B) Protocolo terapêutico: Células de linhagem J774.1 cultivadas em placa de 96 poços foram estimuladas com LPS (0,5 µg/mL) e após 2 horas, incubadas ou não com diferentes concentrações do extrato de *T. argentea.* Após 22 horas da adição do LPS, os sobrenadantes foram coletados e a concentração de nitrito determinada pelo método de Griess. Diferença estatística foi considerada quando $p < 0,05$, pelo Teste *ONE- WAY* ANOVA *post hoc* Tukey, *meio *versus* LPS ou LPS + extratos; #LPS *versus* LPS + extratos.

5.1.3 Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* modifica a liberação de citocinas por macrófagos estimulados com LPS.

Nosso próximo passo foi avaliar se o extrato também teria a capacidade de inibir a produção de citocinas liberadas por macrófagos estimulados com LPS, empregando os mesmos protocolos descritos acima. Assim, os sobrenadantes da cultura obtidos dos macrófagos da linhagem J774.1 foram utilizados para quantificar as citocinas IL-6, TNF-α, IL-1β, e IL-10, empregando método imunenzimatico (ELISA). A figura 4 mostra os resultados obtidos com o protocolo preventivo. Como esperado, LPS induziu a liberação de altas concentrações de IL-6, TNF-α, IL-1β, e IL-10 quando comparado com células com somente meio (controle negativo). Semelhante ao observado com NO, macrófagos pré-incubados com o extrato de *T. argentea* em diferentes concentrações e depois estimulados por 2 horas com LPS

(protocolo preventivo) liberaram significativamente menos IL-6 e TNF-α quando comparados com somente LPS (controle positivo). No entanto, somente a concentração de 125 μg/mL reduziu significativamente a produção de IL-1β quando comparado com células com somente LPS. Além disso, o extrato, nas concentrações de 31,25 e 125 μg/mL, estimulou a produção de IL-10 quando comparado com células estimuladas com LPS.

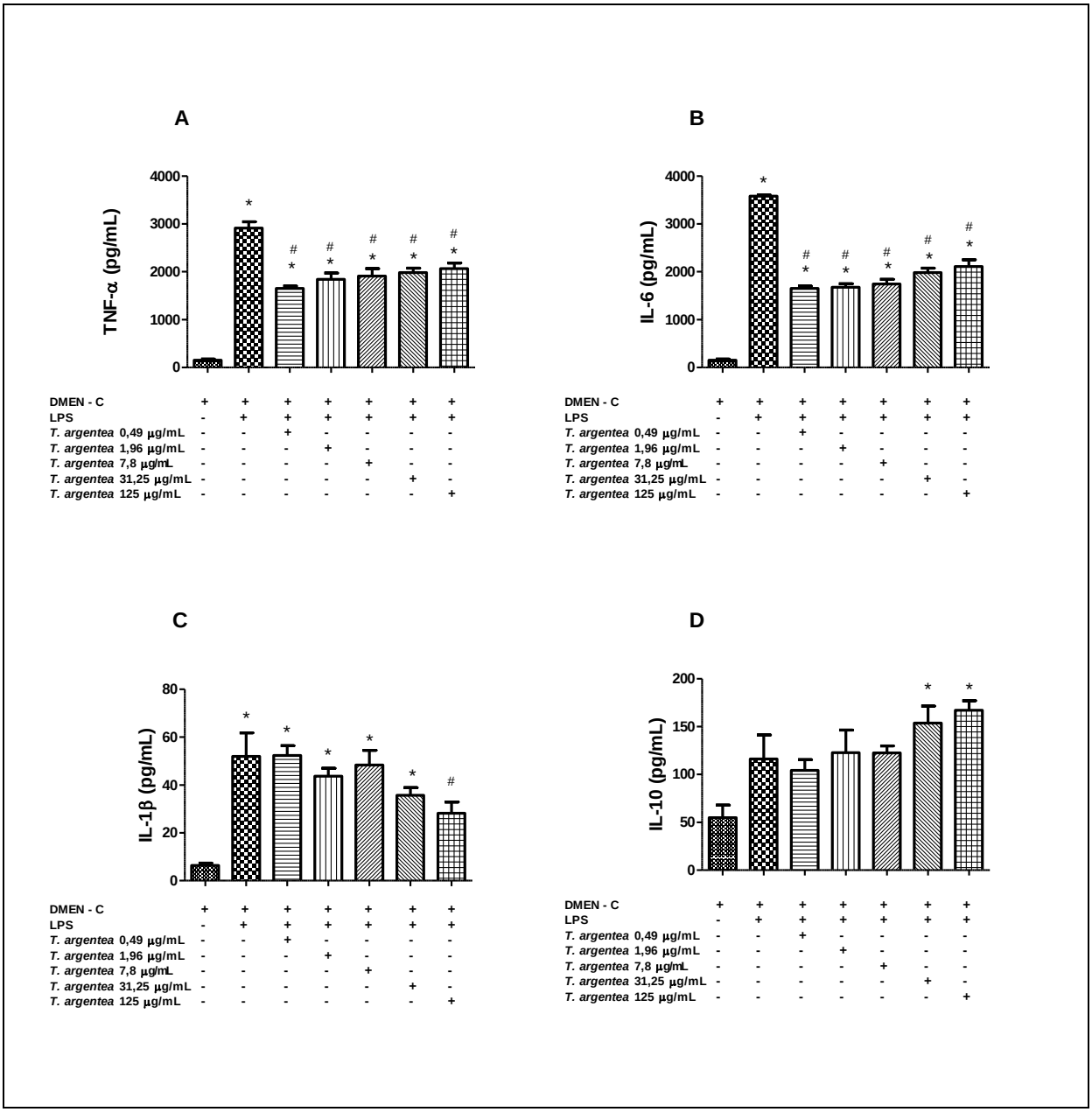


Figura 4. Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* inibe a produção de IL-6, TNF-α e IL-1β, mas aumenta a de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos de linhagem J774.1 (n = 8) cultivados em placa de 96 poços foram pré-incubados com diferentes concentrações do extrato de *T. argentea* e após 2 horas foram estimulados com LPS (0,5 μg/mL) (protocolo preventivo). Após 22

horas do LPS, os sobrenadantes foram coletados para quantificação de TNF-α (A), IL-6 (B), IL-1β (C) e IL-10 (D) pelo método de ELISA. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, pelo teste *ONE- WAY* ANOVA *post hoc* Tukey. *meio *versus* LPS ou LPS + extratos; # LPS *versus* LPS + extratos.

Resultados semelhantes foram obtidos com o protocolo terapêutico. Como mostra Figura 5, macrófagos estimulados com LPS e tratados com as diferentes concentrações de *T. argentea* liberam menos TNF-α e IL-6. No entanto, a inibição de IL-1β somente foi observada com a concentração de 125 μg/mL. Quanto a IL-10, apenas a concentração de 125 μg/mL estimulou a sua produção quando comparada às células estimuladas com LPS.

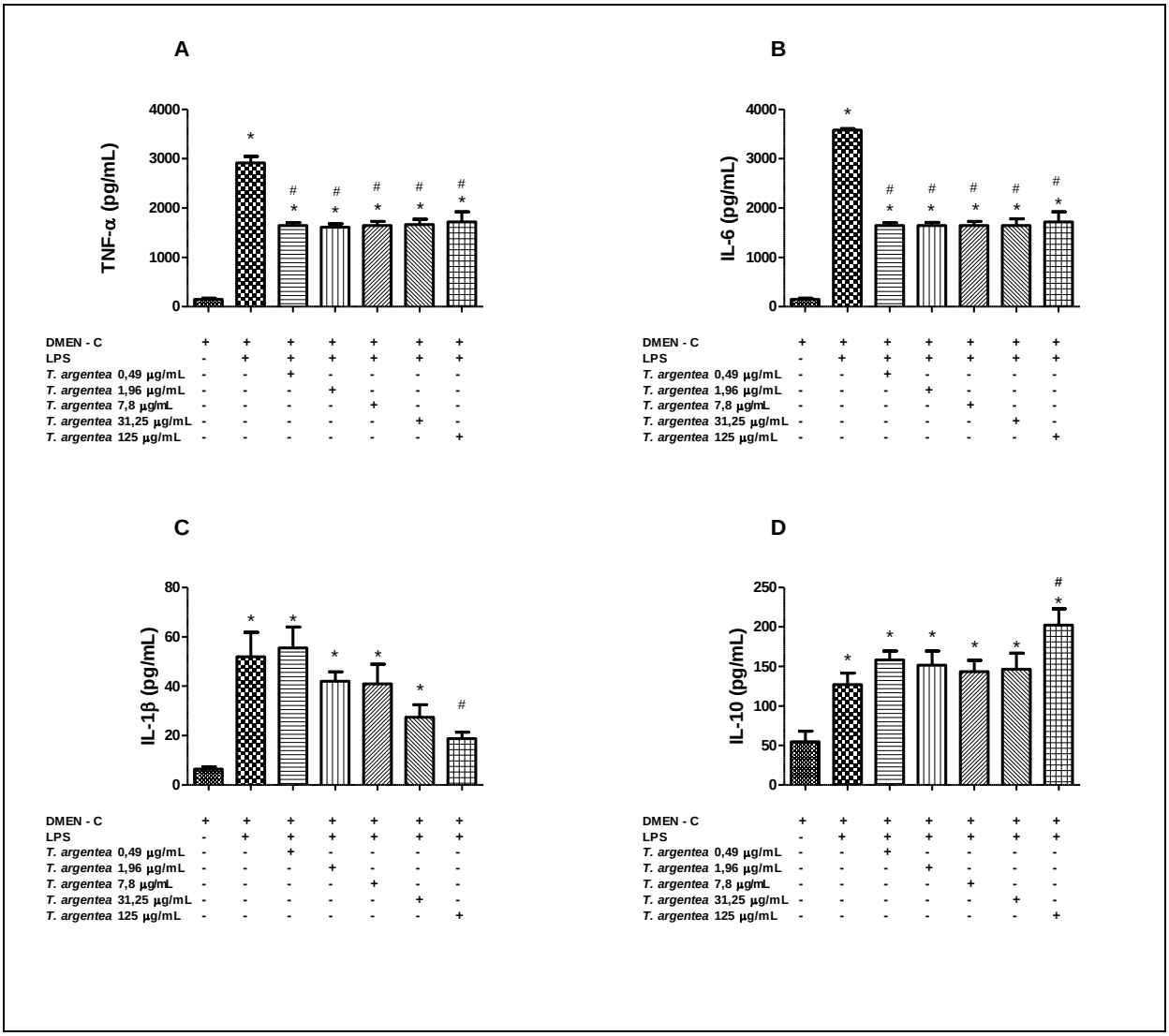


Figura 5. Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* inibe a produção de IL- 6, TNF-α e IL- 1β, mas aumenta a de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos de linhagem J774.1 (n = 8) cultivados em placa de 96 poços foram estimulados com LPS (0,5 μg/mL) e após 2 h de foram incubados com diferentes concentrações do extrato de *T. argentea* (protocolo terapêutico). Após 22 h do tratamento com as diferentes concentrações do extrato, os sobrenadantes foram coletados para

quantificação de TNF-α (A), IL-6 (B), IL-1β (C) e IL-10 (D) pelo método de ELISA. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, pelo teste *One- Way* ANOVA *post hoc* Tukey. * meio *versus* LPS ou LPS + extratos; # LPS *versus* LPS + extratos.

5.1.4 Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* inibe a ativação do fator de transcrição NF- κB

Sabendo que o extrato hidroalcoólico de *T. argentea* diminuiu a produção de TNF-α, IL-1β e IL-6 induzida por LPS, nosso próximo passo foi verificar se este fenômeno seria via inibição do fator de transcrição NF-κB. Para tanto, foram utilizadas células da linhagem RAW 264.7 (macrófagos murinos), transfectadas com gene repórter que expressa de forma estável a fosfatase alcalina secretada embrionária (SEAP) que, quando induzida pelo fator de transcrição NF-κB ou AP-1 apresenta um marcador de seleção de zeocina, que possibilita observar a atividade destes fatores através de ensaio colorimétrico (KARIN & BEN-NERIAH, 2000). Assim, os sobrenadantes da cultura de macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram utilizados para determinar a ativação de NF-κB. As células tratadas apenas com o extrato hidroalcoólico de *T. argentea*, tiveram inibição de NF-κB nas concentrações 31,25 e 125 μg/mL, quando comparadas aquelas cultivadas apenas com meio de cultura, como mostra a Figura 6A. Na Figura 6B, podemos observar que quando as células foram tratadas com as diferentes concentrações do extrato e posteriormente estimulas com o LPS (protocolo preventivo) ocorreu inibição da ativação do fator de transcrição NF-κB, sendo as concentrações de 31,25 e 125 μg/mL as mais eficazes. A Figura 6C demonstra que células estimuladas com o LPS e depois tratadas com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *T. argentea* (protocolo terapêutico) expressam menos o fator de transcrição NF-κB, sendo que nas concentrações mais altas (31,25 e 125 μg/mL) a redução foi maior.

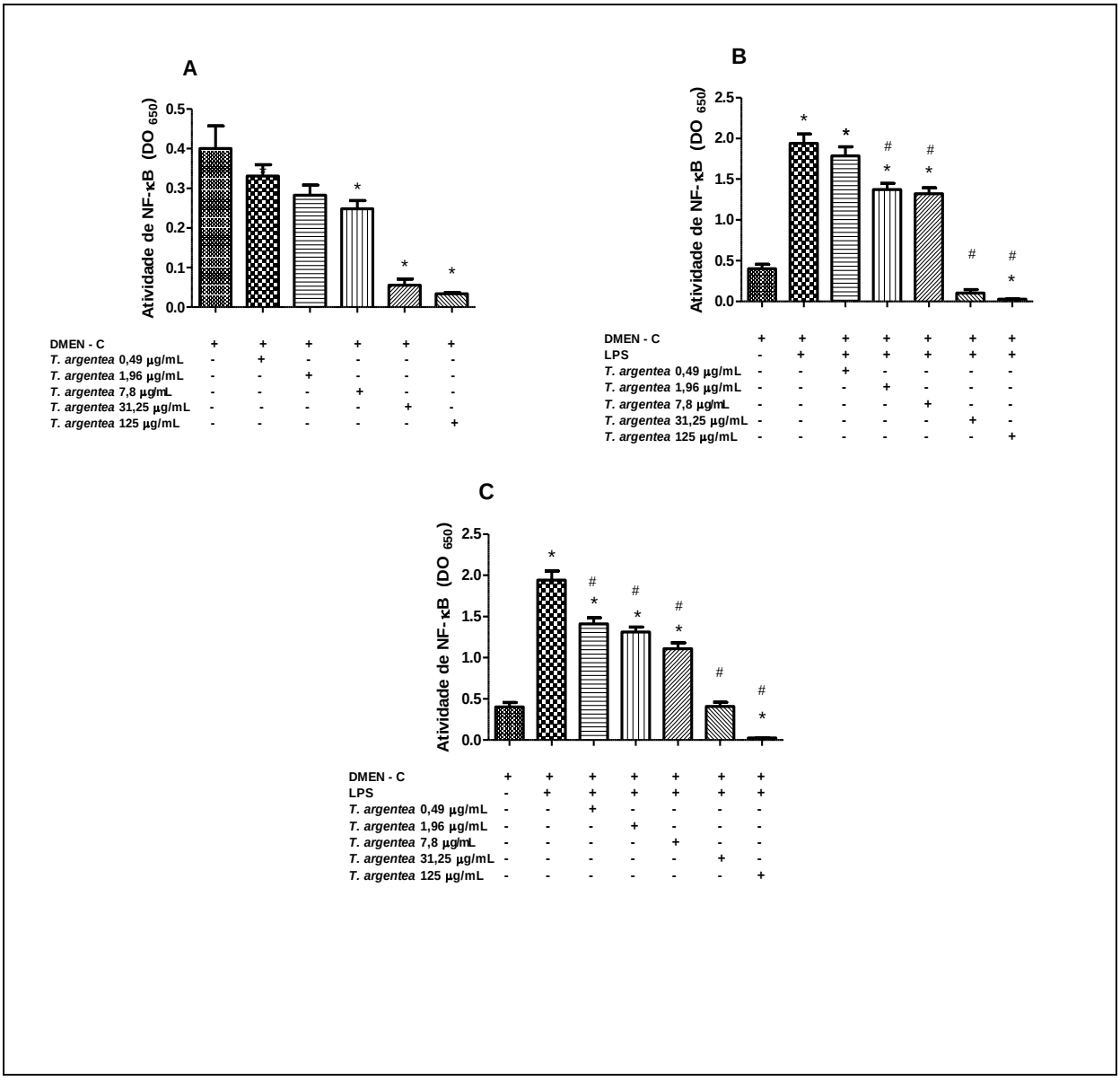


Figura 6. Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* inibe a ativação do fator de transcrição NF- κB induzido por LPS. Macrófagos de linhagem RAW 264.7 (n = 8) cultivados em placa de 96 poços foram incubados com: (A) somente extrato hidroalcoólico de *T. argentea* em diferentes concentrações por 24 horas; (B) extrato hidroalcoólico de *T. argentea* em diferentes concentrações e duas horas depois estimuladas com LPS (protocolo preventivo); e (C) com LPS e 2 horas depois incubados com extrato hidroalcoólico de *T. argentea* em diferentes concentrações. Após 22 horas dos tratamentos com as diferentes concentrações do extrato, os sobrenadantes foram coletados para avaliação da ativação de NF-kB. O substrato QUANTI-BlueTM foi utilizado para medir o SEAP em 650 nm em um espectofotômetro. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, pelo teste *ONE-WAY* ANOVA *post hoc* Tukey. * meio *versus* LPS ou LPS + extratos; # LPS *versus* LPS + extratos.

5.1.5 Extrato hidroalcoólico de *T. argentea* em dose única não é toxico

Após determinarmos que *in vitro* o extrato não é toxico, também analisamos a toxicidade *in vivo,* empregando alta dose administrada uma única vez. A toxicidade aguda por ensaios de dose única tem como finalidade avaliar a dose máxima que poderá ser utilizada nos ensaios *in vivo*, sem que haja efeitos tóxicos. O protocolo utilizado para avaliação da toxicidade aguda foi o preconizado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), método de ensaio 423 (TG 423). O teste de toxicidade aguda revelou que a administração oral de uma dose única de 300 mg/kg, 2000 mg/kg ou 5000 mg/kg de extrato hidroalcoólico de *T. argentea* (n = 3) não revelou quaisquer sinais de toxicidade (queda de peso ou redução no consumo de água e comida, por exemplo) ou mortalidade nos animais tratados durante o período de observação de 14 dias, como demonstra a Tabela 1. Os animais que receberam as doses de 2000 e 5000 mg/kg apresentaram aumento significativo de peso. Além disso, os parâmetros bioquímicos (Figura 7), hematológicos (Figura 8) e a histopatologia (Figura 9) do fígado, rins e baço dos camundongos não mostraram nenhum efeito adverso. Durante todo o período do estudo foi anotado diariamente o peso, o consumo de água e ração dos animais, para análise da avaliação ponderal ou possíveis alterações no comportamento alimentar.

	Média de peso ganho (g)/ grupo (n = 3)		Alimento consumido (g)/grupo (n = 3)		Água consumida (mL) / grupo (n = 3)	
DOSES	DIA 1	DIA 14	DIA 1	DIA 14	DIA 1	DIA 14
300 mg/kg	21,26 ± 0,76	21,94 ± 1,45	350	170	450	220
2000 mg/kg	21,87 ± 0,57	22,80 ± 0,40*	350	163	450	202
5000 mg/kg	21,11 ± 0,77	21,90 ± 0,69	350	172,3	450	217

Tabela 1. Dose única do extrato de *T. argentea* não alterou o consumo de alimento e água, mas animais tiveram ganho de peso quando tratados com a maior dose. Os animais (n = 3), receberam, por gavagem, uma única dose de extrato de *T. argentea* diluído em água nas concentrações de 300, 2000 ou 5000 mg/kg e foram observados por 14 dias. Durante este período os animais foram pesados e as quantidades de comida e água consumidas foram registradas. O protocolo utilizado foi o TG 423 (OECD). Análise estatística pelo *Teste t-student pareado*, $p < 0,05$, *Dia 1 *versus* Dia 14.

As aminotransferases AST e ALT são enzimas intracelulares que se encontram praticamente em todos os tecidos (miocárdio, músculo esquelético, rins, pâncreas, baço cérebro e pulmão), porém em maior concentração nas células

hepáticas. No hepatócito, a AST encontra-se tanto no citoplasma quanto na mitocôndria e a ALT encontra-se somente no citoplasma, portanto a primeira a aparecer em maior concentração no plasma. A ALT é utilizada para medir processo inflamatório ou necrótico do fígado e diagnosticar desordem hepato-celular leve. A AST é útil para avaliar inflamações crônicas. No caso de uma lesão hepática grave, seus níveis séricos aumentam traduzindo alteração total do hepatócito (MINCIS & MINCIS, 2007). A Figura 7 demonstra a concentração de AST/ ALT no plasma de animais tratados com a maior dose (5000 mg/kg) do extrato hidroalcoólico de *T. argentea.* Após avaliação da concentração destas enzimas, observamos que não houve comprometimento das funções hepáticas e nem lesão tecidual, pois o aumento da concentração não foi significativo.

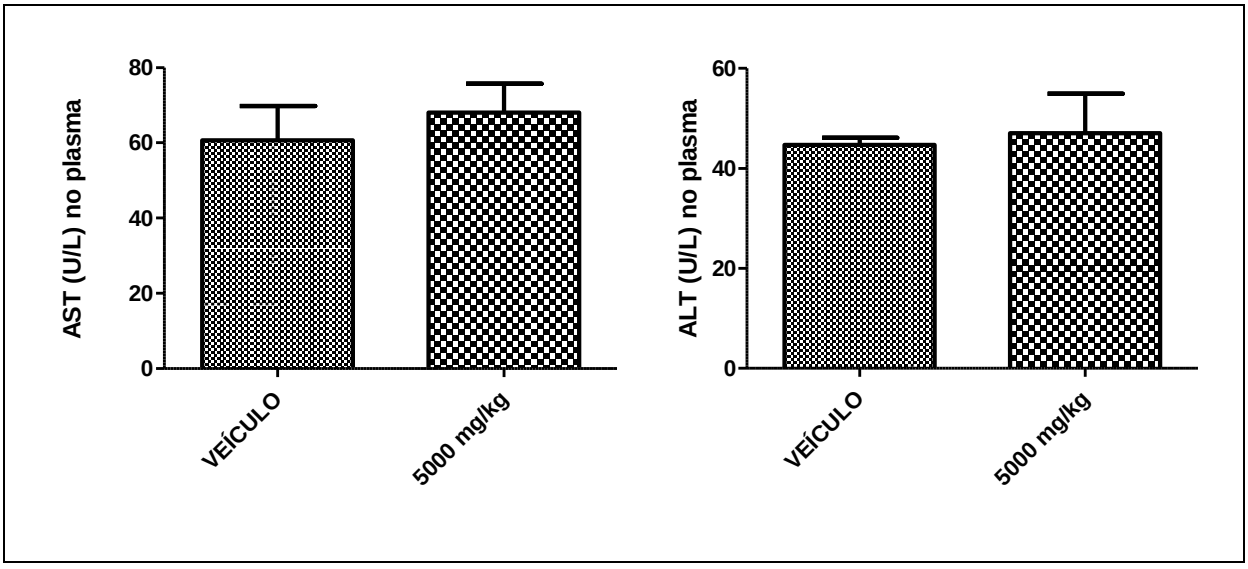


Figura 7. Dose única do extrato de *T. argentea* não foi toxica para camundongos. Um grupo de animais (n = 3), receberam, por gavagem, uma única dose de extrato de *T. argentea* diluído em água na concentração de 5000 mg/kg, e os controles apenas água (veiculo). Os mesmos foram observados por 14 dias, e depois eutanasiados para coleta do sangue para obtenção do plasma, que foi utilizado para a quantificação das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Análise estatística realizada pelo *Teste t-student não paramétrico*.

Na Figura 8 observamos que o tratamento dos animais com doses únicas de 300, 2000 e 5000 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *T. argentea* não modificou o número de leucócitos circulantes.

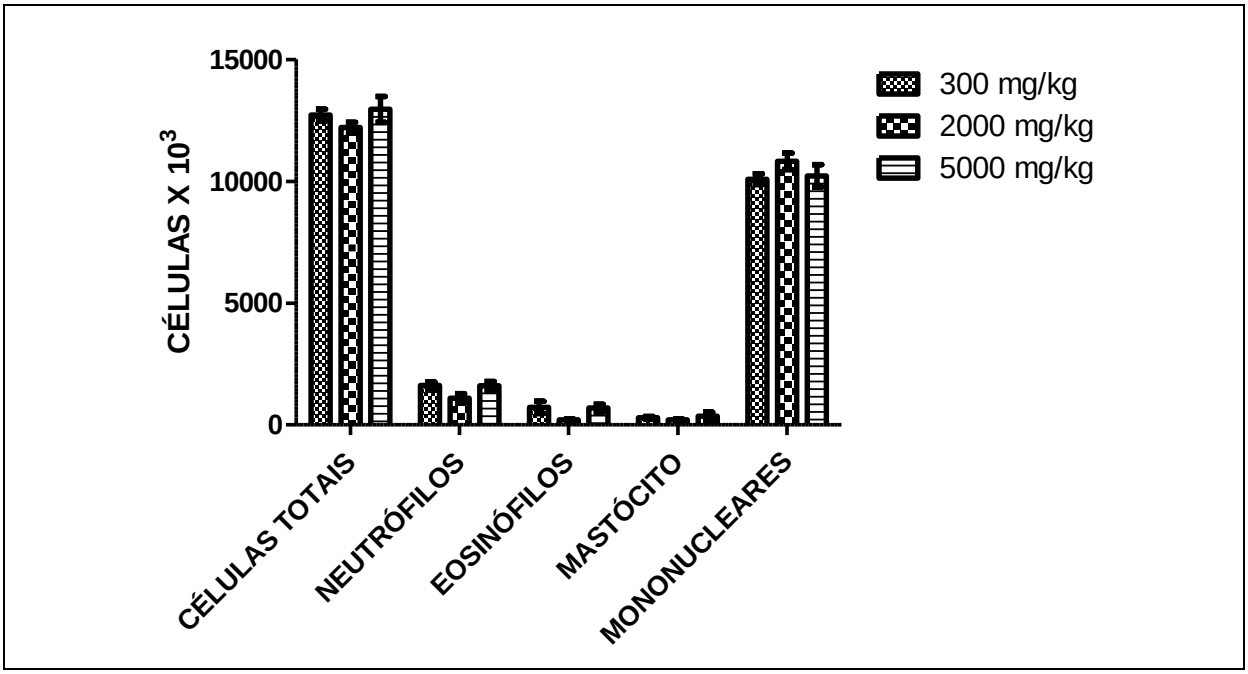


Figura 8. Dose única do extrato de *T. argentea* não alterou o numero de leucócitos circulantes. Os camundongos (n = 3) foram divididos em três grupos e receberam, por gavagem, uma única dose de extrato hidroalcoólico de *T. argentea* diluído em água nas concentrações de 300, 2000 ou 5000 mg/kg e foram observados por 14 dias. Após este período os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para contagem total dos leucócitos utilizando Turk e o esfregaço sanguíneo foi corado com Panótico rápido para contagem diferencial das células. Análise estatística realizada pelo teste *Two-way* ANOVA, com $p < 0,05$.

A análise histológica não revelou alterações significativas no rim, fígado e baço dos animais (Figura 9) que receberam dose única do extrato de *T. argentea* na concentração de 5000 mg/kg, por gavagem. Para analisarmos as alterações comparamos o grupo tratado com dose única do extrato com o grupo que recebeu apenas água no ensaio de toxicidade de doses repetidas, uma vez que o protocolo utilizado na avaliação da toxicidade aguda (OECD TG 423) não preconiza grupo controle.

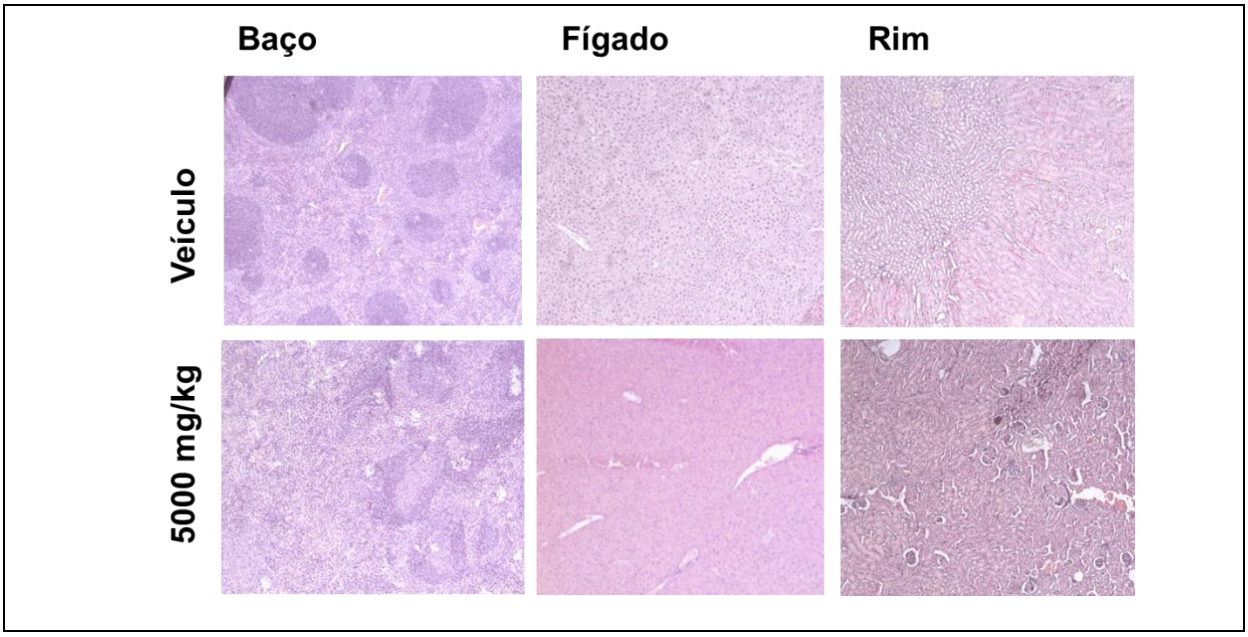


Figura 9. Dose única do extrato de *T. argentea* não alterou a estrutura microscópica dos órgãos. Rim, fígado e baço foram coletados dos animais do grupo que recebeu apenas água (Veículo) e do grupo tratado com o extrato hidroalcoólico de *T. argentea* em dose única na concentração de 5000 mg/kg por gavagem. Os animais foram eutanasiados 14 dias após os tratamentos. Coloração em Hematoxilina/Eosina. Microscópio óptico. Imagens dos rins, fígado e baço: 100 X.

5.1.6 Doses repetidas do extrato hidroalcoólico de *T. argentea* não induz efeitos tóxicos

Os ensaios com doses repetidas tiveram como finalidade avaliar os possíveis efeitos tóxicos das doses de 300 ou 1000 mg/kg, administradas duas vezes ao dia (12/12 horas) por 14 dias. O protocolo foi o recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - *GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE TOXICOLOGIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS* (ANVISA, 2013). Os resultados neste teste não revelaram sinais de toxicidade (queda de peso ou redução no consumo de água e/ou comida, por exemplo). Nenhuma das doses induziu mortalidade dos camundongos nos 14 dias de observação (Tabela 2). Novamente, observamos ganho significativo de peso em animais de ambos os sexos que receberam 1000 mg/kg do extrato. Os parâmetros bioquímicos (Figura 10), hematológicos (Figura 11) e a histopatológicos (Figura 12) do fígado, rins, pulmão e baço dos camundongos não apresentaram nenhuma alteração perceptível.

			CONTROLE	300 mg/kg	1000 mg/kg
Machos	Média do peso ganho (g)/grupo (n = 4)	DIA 1	24,24 ± 2,45	24,74 ± 1,74	24,12 ± 1,03
		DIA 14	24,39 ± 1.97	25,71 ± 1,72 *	25,29 ± 0,90 *
	Alimento consumido (g)/grupo (n = 4)	DIA 1	350	350	350
		DIA 14	242	241	236,3
	Água consumida (mL) /grupo (n = 4)	DIA 1	350	350	350
		DIA 14	212	217	215
Fêmeas	Média do peso ganho (g)/grupo (n = 4)	DIA 1	20,86 ± 0,63	21,74 ± 0,71	20,8 ± 0,55
		DIA 14	21,03 ± 0,32	22,13 ± 0,50 *	21,9 ± 0,64 *
	Alimento consumido (g)/grupo (n = 4)	DIA 1	350	350	350
		DIA 14	229	236	232.6
	Água consumida (mL) /grupo (n = 4)	DIA 1	350	350	350
		DIA 14	206	210	203

Tabela 2. Doses repetidas do extrato de *T. argentea* não modificaram o consumo de alimento e de água, mas animais tiveram ganho de peso com as maiores doses. Os animais divididos em macho (n = 4) e fêmea (n = 4), receberam por gavagem, a cada 12 horas e durante 14 dias, as doses de 300 ou 1000 mg/kg de extrato de *T. argentea* diluído em água. Animais tratados apenas com água (veículo) no mesmo esquema foram empregados como controle. Durante este período os animais foram pesados e as quantidades de comida e água consumidas foram registradas. O protocolo utilizado neste ensaio é o preconizado pela ANVISA (2013). Análise estatística por *ONE- WAY* ANOVA, $p < 0,05$. * Veiculo *versus* extratos.

A figura 10 monstra que a maior dose empregada (1000 mg/kg) do extrato de *T. argentea* não alterou a concentração circulante de AST/ALT quando comparada com a dos animais do grupo controle.

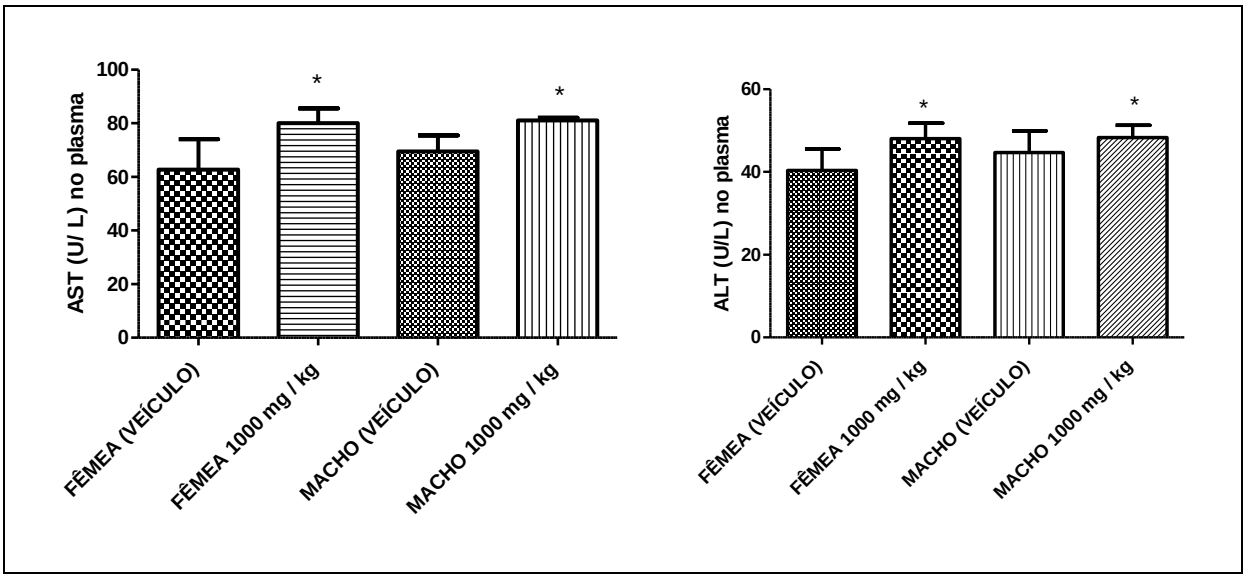


Figura 10. Doses repetidas do extrato de *T. argentea* não foram tóxicas para camundongos. Os animais (n = 4) receberam por gavagem a cada 12 horas durante 14 dias, água (controle) ou a dose de 1000 mg/kg do extrato de *T. argentea* diluído em água. Após este período os animais foram eutanasiados e o plasma coletado para quantificação das enzimas aspartato aminotransferase

(AST) e alanina aminotransferase (ALT). Análise estatística realizada por *ONE- WAY* ANOVA, *pot hoc* Tukey sendo $p < 0,05$ considerado significativo. *veículo *versus* 1000 mg/kg (fêmea) ou 1000 mg/kg (macho).

A Figura 11 mostra que o tratamento dos animais com doses repetidas de 300 ou 1000 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *T. argentea* não modificou o número de leucócitos circulantes.

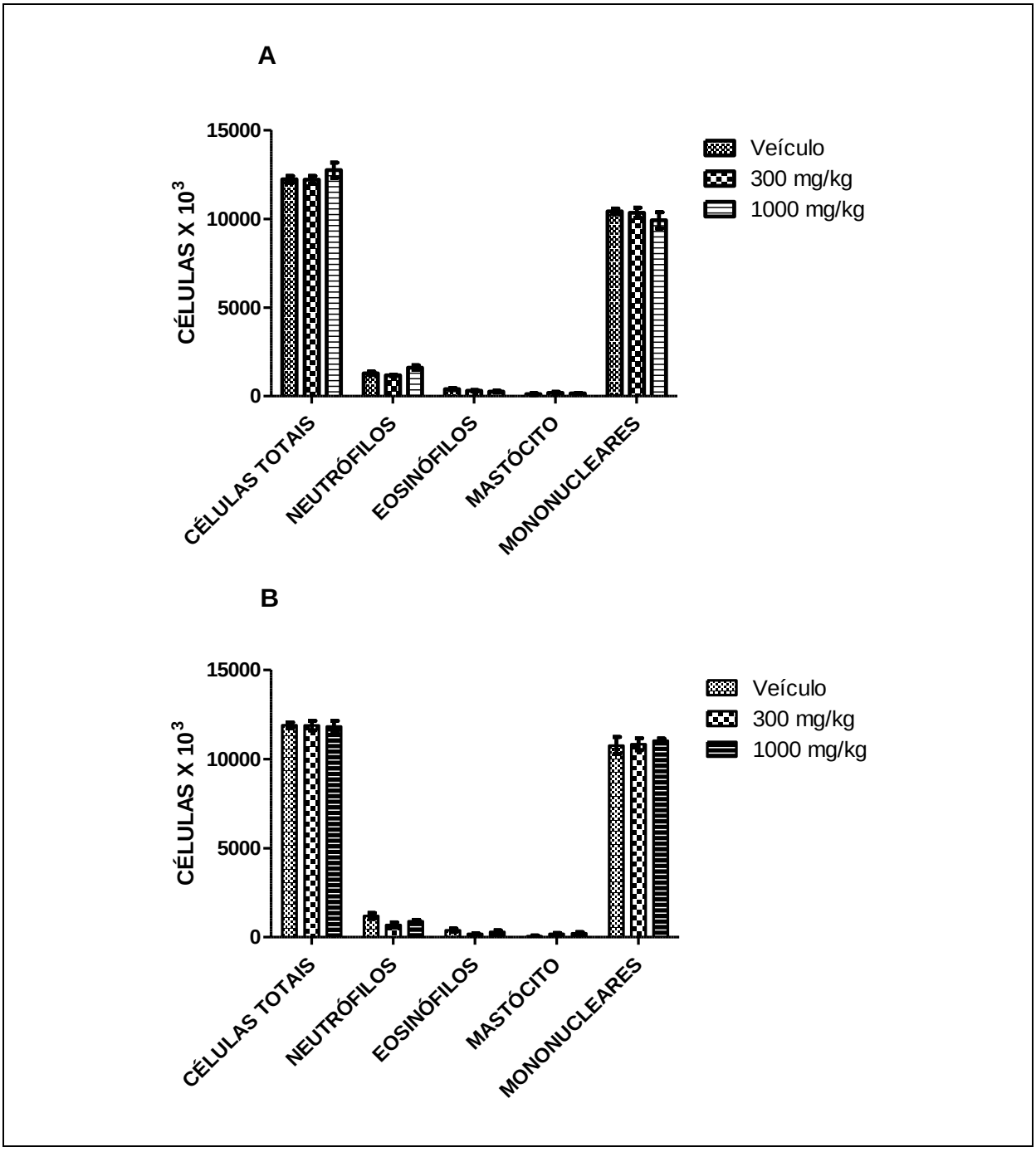


Figura 11. Doses repetidas do extrato de *T. argentea* não alteraram o numero de leucócitos circulantes. Os animais (n = 4) machos (A) e fêmea (B) foram divididos em três grupos e receberam,

por gavagem a cada 12 horas água (controle) ou as doses de 300 e 1000 mg/kg de extrato de *T. argentea,* por 14 dias. Após este período os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado para contagem total com solução de Turk e o esfregaço sanguíneo foi corado com Panótico Rápido, para contagem diferencial das células. Análise estatística realizada pelo teste *Two- Way* ANOVA, com $p < 0,05$ considerado significativo.

A análise histológica não revelou alterações significativas no rim, fígado e baço dos animais (Figura 12) que receberam as doses do extrato de *T. argentea* na concentração de 300 ou 1000 mg/kg, por gavagem, durante 14 dias.

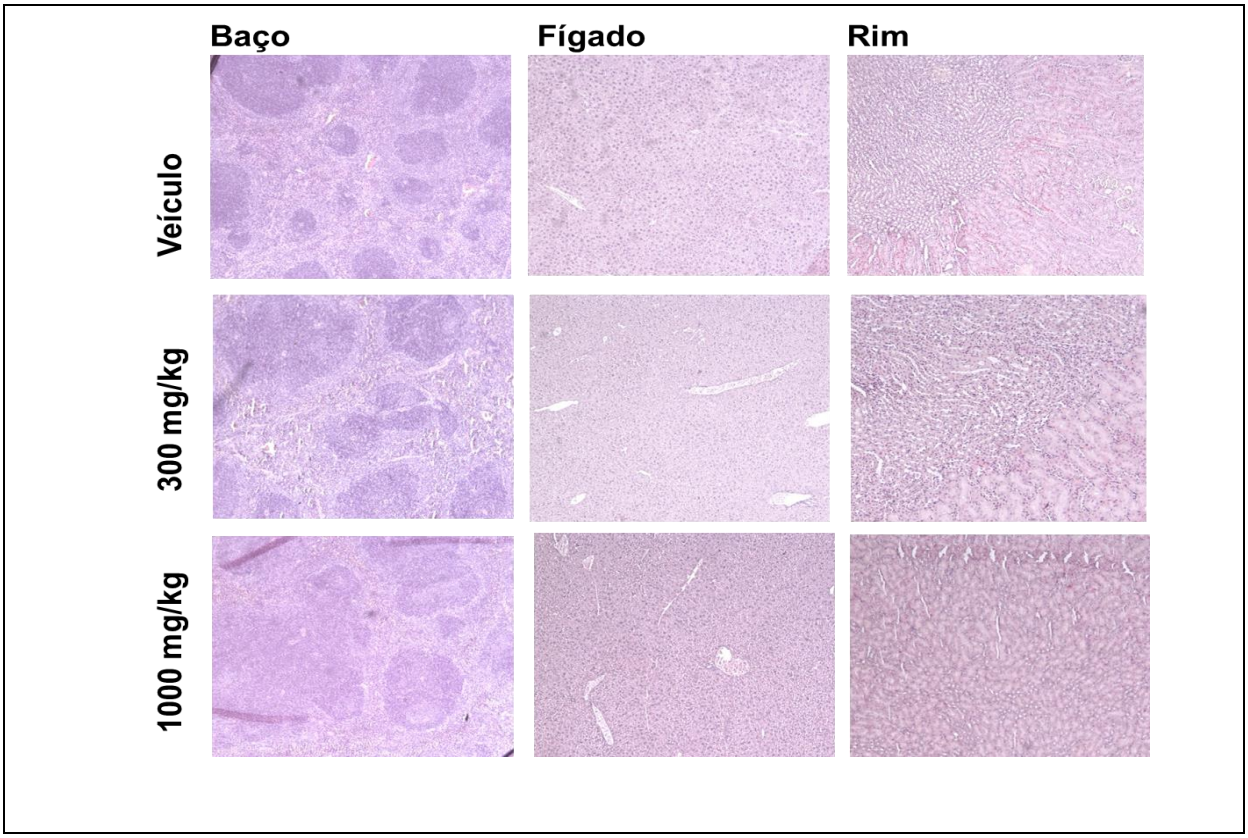


Figura 12. Doses repetidas do extrato de *T. argentea* não alterou a estrutura microscópica dos órgãos. Rim, fígado e baço foram coletados dos animais do grupo que recebeu apenas água (veículo) e dos grupos tratados com o extrato hidroalcoólico de *T. argentea* em doses repetidas de 300 ou 1000 mg/kg por gavagem. Os animais foram eutanasiados 14 dias após. Coloração em Hematoxilina/Eosina. Microscópio óptico. Imagens dos rins, fígado e baço: 100 X.

5.1.7. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato de *T. argentea*

Após definir as doses que seriam utilizadas, nosso próximo passo foi avaliar o potencial anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de *T. argentea*. O modelo de inflamação utilizado foi a bolha de ar inoculada com LPS. Como mostrado

nas Figuras 13 e 14, os animais que receberam apenas o extrato na concentração de 300 mg/kg não apresentaram alterações na concentração de proteínas e de células recuperadas da cavidade quando comparados com animais inoculados com PBS (controle). Os animais que receberam LPS tiveram aumento significativo na concentração de proteínas e de células recuperadas do exsudato inflamatório (controle positivo). O tratamento com o extrato, nas concentrações 5, 60 ou 300 mg/kg, inibiu (com diferentes magnitudes) a concentração de proteínas e o numero de células recrutadas para a bolha, induzidos pela inoculação de LPS (Figuras 13 e 14).

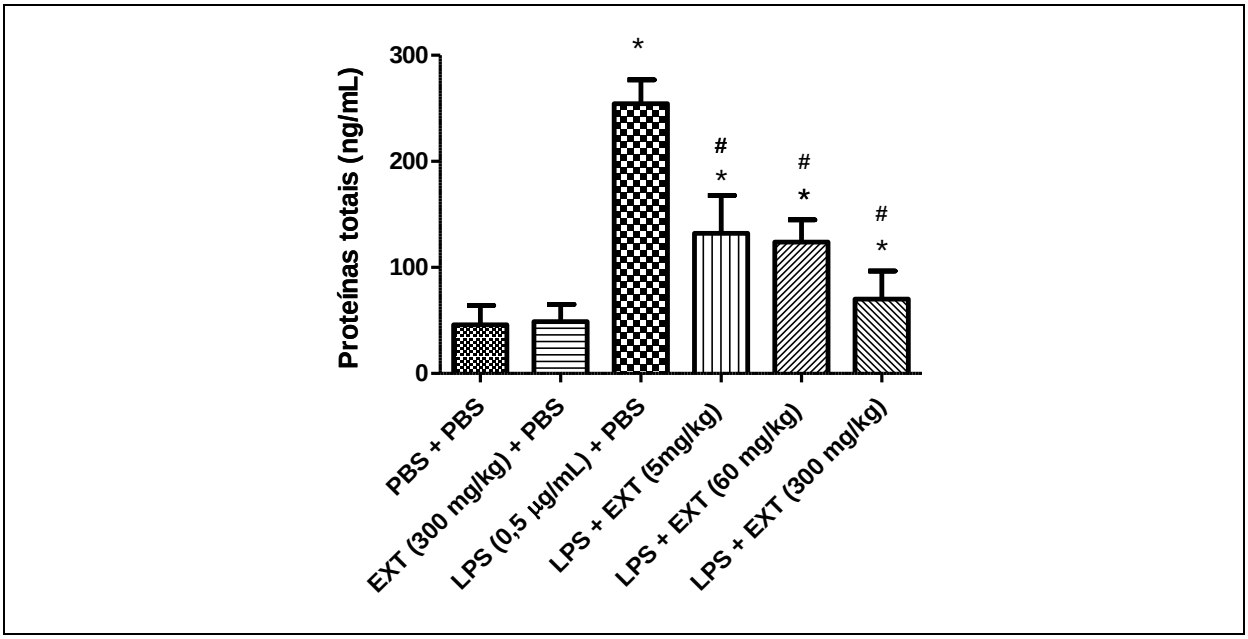


Figura 13. O extrato de *T. argentea* inibiu o edema induzido por LPS. Os camundongos foram divididos em grupos (n = 4), e receberam no interior da bolha de ar PBS + PBS; PBS e extrato hidroalcoólico de *T. argentea* (300 mg/kg) (EXT + PBS); LPS (0,5 μg/mL) e PBS (LPS + PBS); LPS (0,5 μg/mL) e 1 hora depois os extrato (LPS + EXT) nas concentrações de 5, 60 ou 300 mg/kg. Após 4 horas o tratamento com as diferentes doses do extrato, os animais foram eutanasiados, a cavidade lavada com PBS heparinizados e centrifugado. A concentração de proteínas foi determinada pela reação de Bradford. Diferenças estatísticas empregando *One- Way ANOVA,* teste *post hoc* Tukey, foram consideradas com $p < 0,05$. * PBS + PBS *versus* LPS + PBS; # LPS + PBS *versus* LPS + EXT

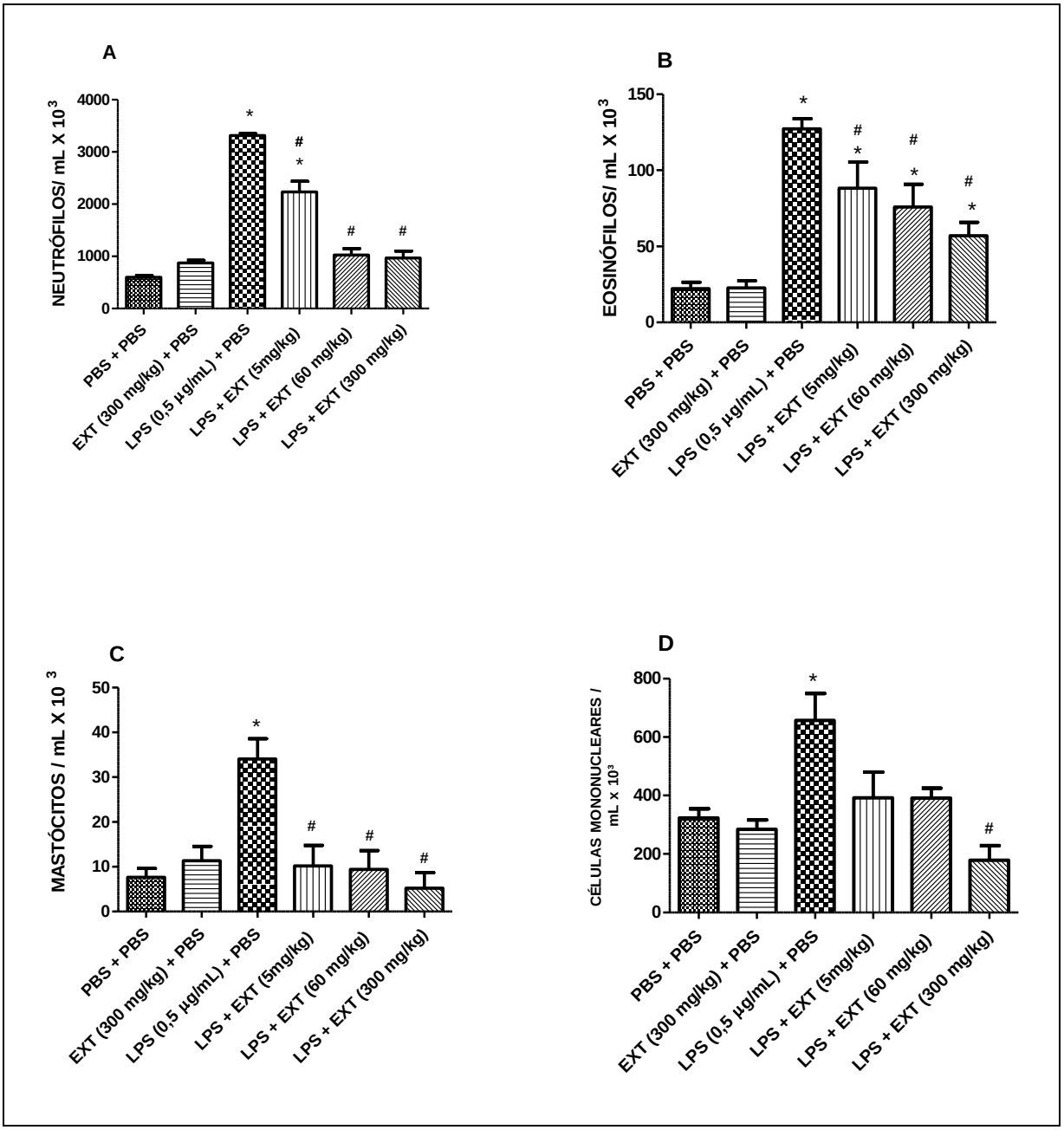


Figura 14. O extrato de *T. argentea* inibiu o recrutamento de células induzido por LPS. Os camundongos foram divididos em grupos (n = 4), e receberam no interior da bolha de ar PBS-PBS; PBS e extrato hidroalcoólico de *T. argentea* (300 mg/kg) (EXT + PBS); LPS (0,5 μg/mL) e PBS (LPS + PBS); LPS (0,5 μg/mL) e 1 hora depois os extrato (LPS + EXT) nas concentrações de 5, 60 ou 300 mg/kg. Após 4 horas do tratamento com as diferentes doses do extrato, os animais foram eutanasiados, a cavidade lavada com PBS heparinizados. O recrutamento celular foi determinado pela contagem total e diferencial de neutrófilos (A), eosinófilos (B), mastócitos (C) e células mononucleares (D). Diferenças estatísticas empregando *One- Way ANOVA,* teste *post hoc* Tukey, foram consideradas com $p < 0,05$. * PBS + PBS *versus* LPS + PBS; # LPS + PBS *versus* LPS + EXT

Como observamos que o extrato inibiu a inflamação induzida pelo LPS, nosso próximo passo foi quantificar as citocinas presentes nos lavados das bolhas de ar, empregando método de ELISA. Como mostrado na Figura 15, o LPS induziu a

liberação de IL-6, IL-1β e TNFα, mas não de IL-10. No entanto, somente o tratamento da bolha inflamada com o extrato hidroalcoólico de *T. argentea* na concentração de 300 mg/kg inibiu a liberação das citocinas inflamatórias IL-6, TNF-α e IL-1β. Interessante, que o extrato nas três concentrações empregadas (5, 60 ou 300 mg/kg), e na presença do LPS, induziu a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Além disso, o extrato na maior concentração aumentou a produção de IL-10, mesmo na ausência de LPS.

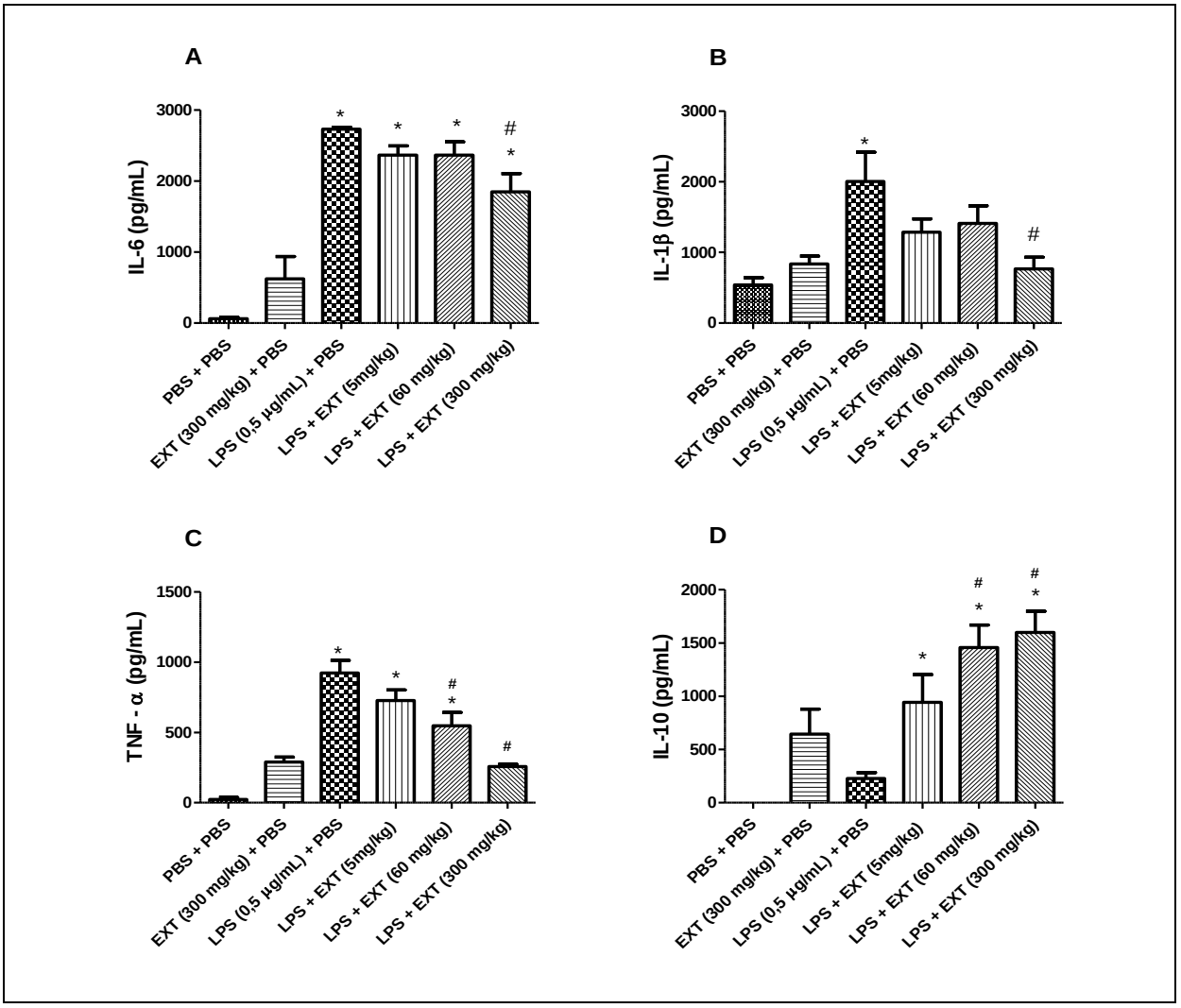


Figura 15 - O extrato hidroalcoólico de *T. argentea* alterou a concentração de citocinas nos camundongos que receberam LPS. Os camundongos foram divididos em grupos (n = 4), e receberam no interior da bolha de ar PBS-PBS; PBS e extrato hidroalcoólico de *T. argentea* (300 mg/kg) (EXT-PBS); LPS (0,5 µg/mL) e PBS (LPS-PBS); LPS (0,5 µg/mL) e 1 hora depois os extrato nas concentrações de 5, 60 ou 300 mg/kg. Após 4 horas do tratamento com as diferentes doses do extrato, os animais foram eutanasiados, a cavidade lavada com PBS heparinizado. As concentrações das citocinas indicadas foram determinadas por ELISA. Diferença estatísticas empregando *ONE WAY* ANOVA, teste *post hoc* Tukey, foram consideradas com $p < 0,05$. * PBS *versus* LPS; # LPS *versus* LPS + extratos.

5.2 PARTE II

5.2.1 Extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* não é citotóxico para macrófagos peritoneais da linhagem J774.1

Macrófagos peritoneais da linhagem J774.1, incubados com diferentes concentrações do extrato de *A. colubrina var. colubrina* foram utilizados para avaliar a citotoxicidade. As células foram semeadas e tratadas com as concentrações de 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 μg/mL do extrato, e em seguida incubadas por 24 horas. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram retirados e as células receberam o corante brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Como controle positivo utilizamos DMSO, que mata 100% das células quando em concentrações maiores que 3 μg/mL. Células com meio mais o veiculo diluente dos extratos foram usadas como controle negativo da citotoxicidade. Os resultados mostraram que nenhuma das doses utilizadas foram tóxicas para os macrófagos. Com base neste resultado escolhemos doses menores do que 1000 μg/mL para as análises dos efeitos do extrato nos demais experimentos *in vitro*. A dose de 1000 μg/mL foi a maior dose avaliada.

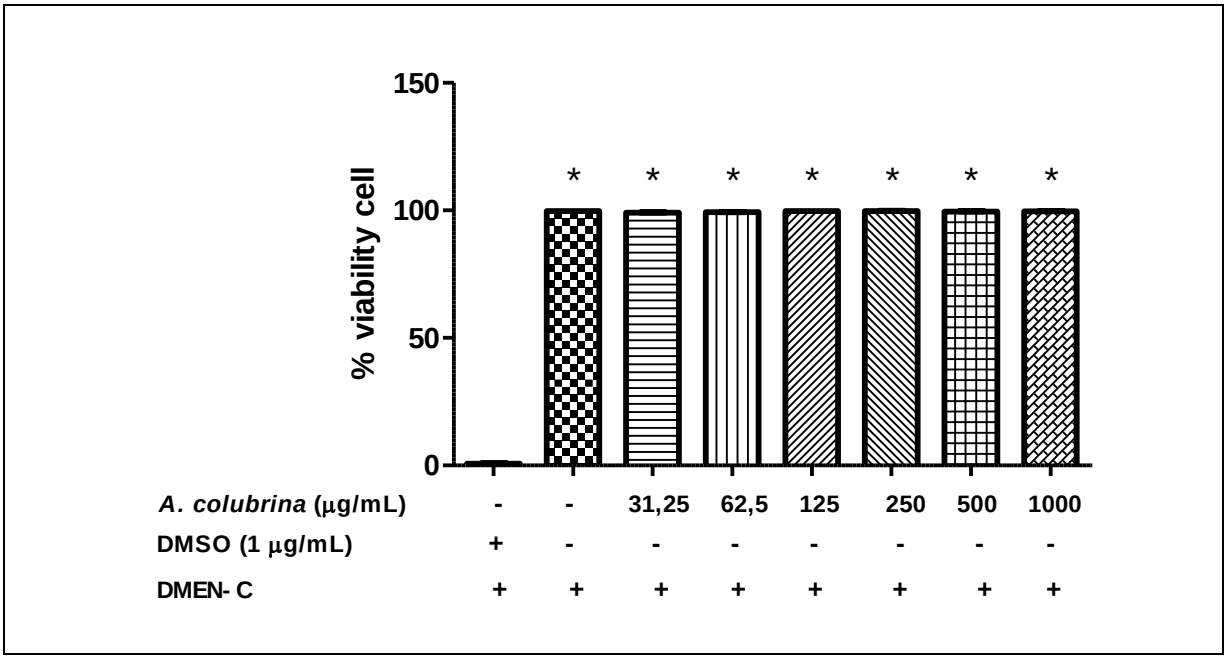


Figura 16. O extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* não altera a viabilidade celular. As células J774.1 (n = 8) foram cultivadas em microplaca de 96 cavidades e incubadas por 2 horas para adesão. Após este período o meio de cultura foi substituído por meio DMEN-C contendo

diferentes concentrações dos extratos de *A. colubrina var. colubrina*. O controle negativo foi meio de cultura adicionado do veiculo diluente dos extratos (DMEN- C) e o controle positivo 3μg/mL de DMSO. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Cada coluna representa a média de oito (n = 16) poços de dois experimentos independentes. A absorbância foi medida em 570 nm com espectrofotômetro. Diferenças consideradas estatisticamente significativa com $p < 0,05$, pelo teste *ONE WAY*- ANOVA *post hoc* Tukey. * DMSO *versus* extratos.

5.2.2 Extrato de *A. colubrina var. colubrina* inibe a liberação de óxido nítrico de macrófagos estimulados com LPS.

A quantificação de óxido nítrico (NO) foi realizada no sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos (linhagem J774.1) estimulados com LPS e tratados ou não com diferentes concentrações do extrato, empregando dois protocolos, um preventivo e outro terapêutico. No protocolo preventivo (Figura 17A), as células foram tratadas com os extratos de *A. colubrina* var. *colubrina* nas concentrações de 0,49; 1,96; 7,8; 31,25; e 125 μg/mL, e após 2 horas receberam LPS (0,5 μg/mL), um indutor da liberação de NO. No protocolo terapêutico (Figura 17B), os macrófagos foram estimulados com LPS (0,5 μg/mL) e após 2 horas de incubação receberam o extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* nas mesmas concentrações acima. Nossos resultados demonstraram que, todas as concentrações do extrato inibiram a produção de NO, nos dois protocolos, quando comparado com a produção induzida pelo LPS apenas.

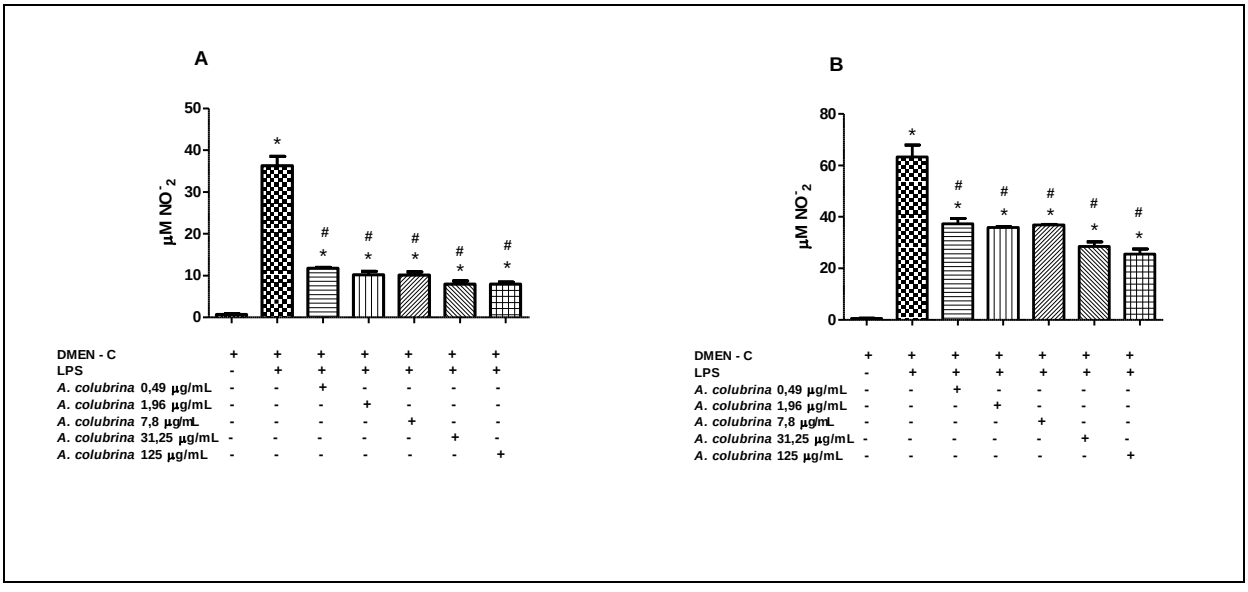


Figura 17. Extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* inibe a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS. (A) Protocolo preventivo: Macrófagos da linhagem

J774.1 (n = 8) cultivados em placa de 96 poços foram pré-incubados ou não com diferentes concentrações do extrato de *A. colubrina var. colubrina* e após 2 horas estimuladas com LPS (0,5 μg/mL) por 22 horas. (B) Protocolo terapêutico: Células de linhagem J774.1 cultivadas em placa de 96 poços foram estimuladas com LPS (0,5 μg/mL) e após 2 horas, incubadas ou não com diferentes concentrações do extrato de *A. colubrina var. colubrina.* Após 22 horas da adição do LPS, os sobrenadantes foram coletados e a concentração de nitrito determinada pelo método de Griess. Diferença estatística foi considerada quando $p < 0,05$ pelo Teste *ONE- WAY* ANOVA *post hoc* Tukey, *meio *versus* LPS ou LPS + extratos; #LPS *versus* LPS + extratos.

5.2.3 Extrato de *A. colubrina var. colubrina* modifica a liberação de citocinas por macrófagos estimulados com LPS.

Em seguida avaliamos se o extrato teria a capacidade de inibir a produção de citocinas liberadas por macrófagos estimulados com LPS, empregando os mesmos protocolos descritos acima. Desse modo, os sobrenadantes obtidos da cultura de macrófagos da linhagem J774.1 foram utilizados para quantificar as citocinas IL-6, TNF-α, IL-1β, e IL-10, empregando método imunoenzimatico (ELISA). A figura 18 mostra os resultados obtidos com o protocolo preventivo. Como esperado, o LPS induz a liberação de altas concentrações de IL-6, TNF-α, IL-1β, e IL-10 quando comparado com células com somente meio (controle negativo). Como observamos com NO, macrófagos pré-incubados com o extrato de *A. colubrina var. colubrina* em diferentes concentrações e depois estimulados por 2 horas com LPS (protocolo preventivo) liberaram significativamente menos IL-6 (Figura 18A) quando comparados com somente LPS (controle positivo). Células incubadas com as concentrações de 31,25 e 125 μg/mL liberaram menos TNF-α (Figura 18C), quando comparadas com somente LPS. No entanto, somente a concentração de 125 μg/mL reduziu significativamente a produção de IL-1β (Figura 18B) quando comparada com células com somente LPS. As concentrações de 7,8 e 31,25 μg/mL estimularam a produção de IL-10 (Figura 18D) quando comparada a células com somente LPS.

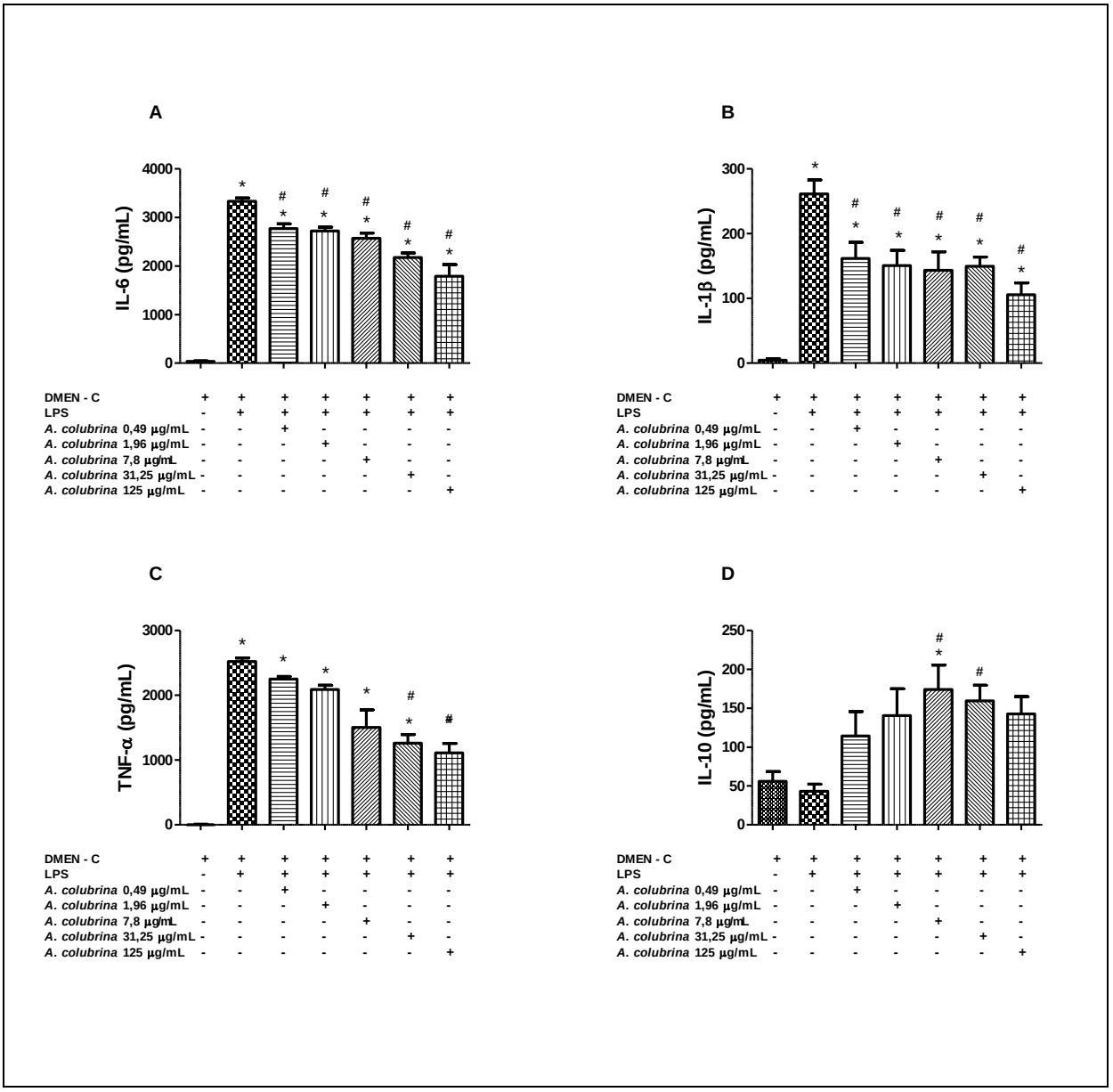


Figura 18. Extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* inibe a produção de IL-6, TNFα e IL-1β, mas aumenta a de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos da linhagem J774.1 (n = 8) cultivados em placa de 96 poços foram pré-incubados com diferentes concentrações do extrato de *A. colubrina var. colubrina* e após 2 horas de foram estimulados com LPS (0,5 µg/mL) (protocolo preventivo). Após 22 h do LPS, os sobrenadantes foram coletados para quantificação de IL-6 (A), IL-1β (B), TNF-α (C) e IL-10 (D) pelo método de ELISA. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, pelo teste *One- Way* ANOVA *post hoc* Tukey. *meio *versus* LPS ou LPS + extratos; # LPS *versus* LPS + extratos.

Resultados semelhantes foram obtidos com o protocolo terapêutico. Como demonstra a Figura 19, macrófagos estimulados com LPS e depois tratados com as diferentes concentrações de *A. colubrina var. colubrina* liberaram menos IL-1β e IL-6, quando comparados às células tratadas apenas com LPS. Porém, a inibição de TNF-α somente foi observada com as concentrações de 7,8 µg/mL,

31,25 μg/mL e 125 μg/mL. Quanto a IL-10, apenas as concentrações de 7,8 μg/mL e 31,25 μg/mL estimularam a sua produção quando comparada às células estimuladas com LPS (controle positivo).

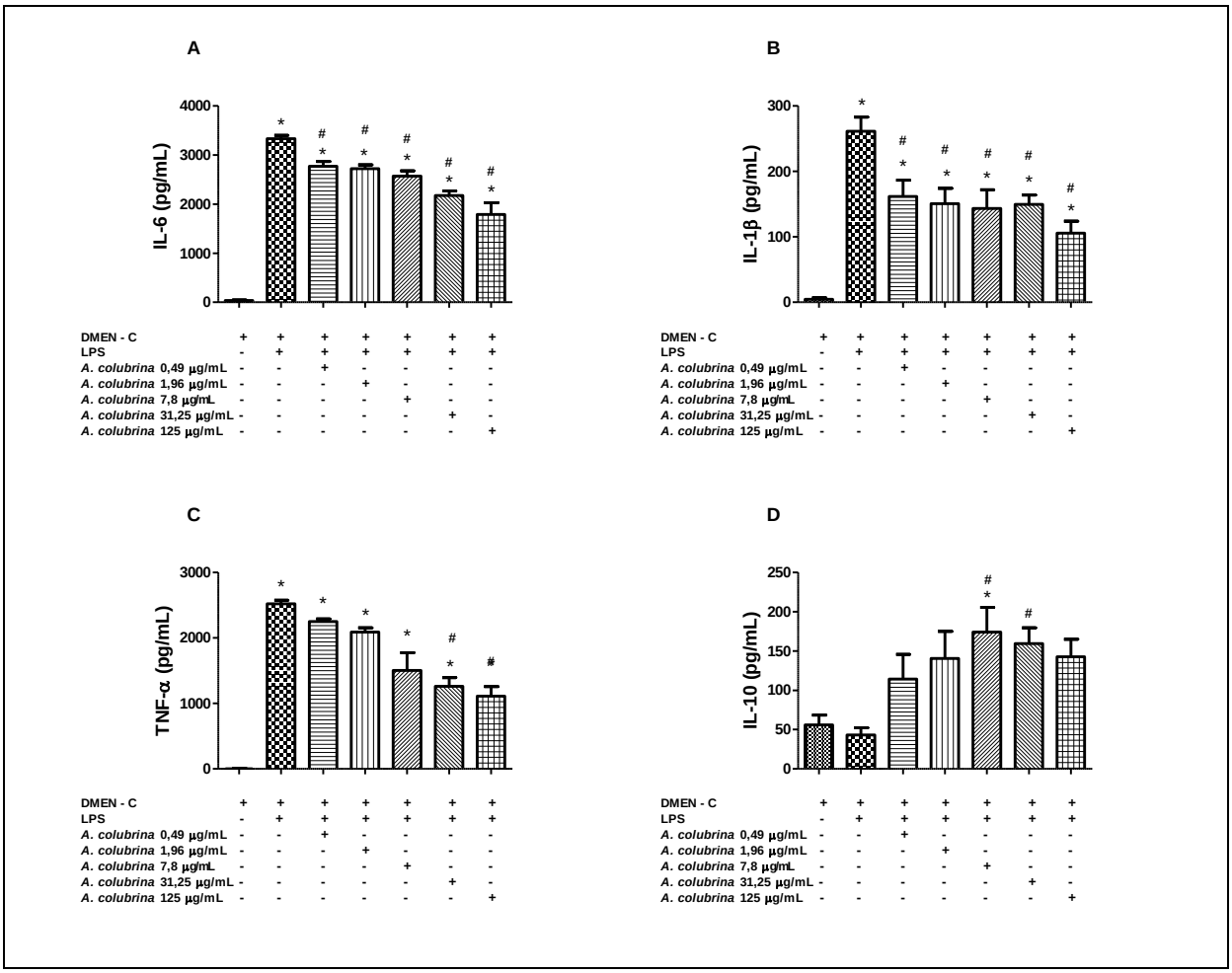


Figura 19. Extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* inibe a produção de IL-6, TNFα e IL-1β, mas aumenta a de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos da linhagem J774.1 (n = 8) cultivados em placa de 96 poços foram estimulados com LPS (0,5 μg/mL) e após 2 horas foram incubados com diferentes concentrações do extrato de *A. colubrina var. colubrina*(protocolo terapêutico). Após 22 horas do tratamento com as diferentes concentrações do extrato, os sobrenadantes foram coletados para quantificação de IL-6 (A), IL-1β (B), TNF-α (C) e IL-10 (D) pelo método de ELISA. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, pelo teste *ONE- WAY* ANOVA *post hoc* Tukey. * meio *versus* LPS ou LPS + extratos; # LPS *versus* LPS + extratos.

5.2.4 Extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* inibe a ativação do fator de transcrição NF- κB

Mediante os resultados acima, nosso próximo passo foi verificar se o extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* teria a capacidade de inibir o

fator de transcrição NF-kB. Para tanto, os sobrenadantes da cultura obtidos dos macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram utilizados para avaliar a ativação NF-κB. As células tratadas apenas com as diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina*, apresentaram inibição de NF-κB, em todas as concentrações, quando comparadas a células que foram cultivadas apenas com meio de cultura, como mostra a Figura 20A. Nas Figuras 20B e 20C, observamos que tanto as células submetidas ao protocolo preventivo, quanto ao protocolo terapêutico apresentaram menor expressão do fator de transcrição NF-κB na concentração de 125 μg/mL quando comparadas com as células que receberam apenas LPS.

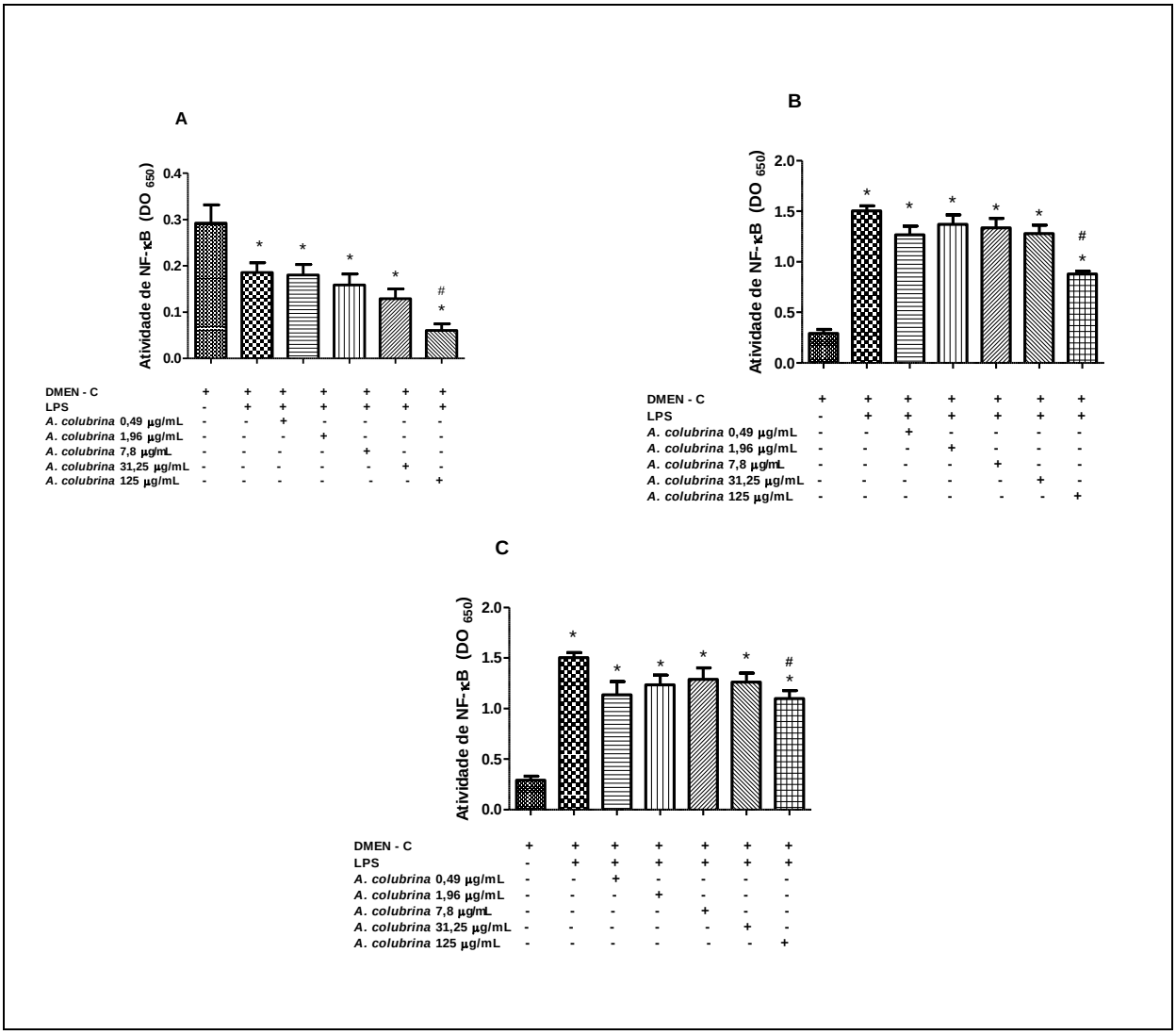


Figura 20. Somente alta concentração do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* inibe a ativação do fator de transcrição NF-κB em macrófago estimulados com LPS. Macrófagos de linhagem RAW 264.7 (n = 8) cultivados em placa de 96 poços foram incubados com: (A) extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* em diferentes concentrações por 24 horas; (B) extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* em diferentes concentrações e 2 horas depois

estimulados com LPS (protocolo preventivo); e (C) com LPS e 2 horas depois tratados com extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* em diferentes concentrações. Após 22 h do estímulo com LPS ou do tratamento com as diferentes concentrações do extrato, os sobrenadantes foram coletados para avaliação da ativação de NF-kB. O substrato QUANTI-BlueTM foi utilizado para medir o SEAP a 650 nm com espectofotômetro. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, pelo teste *ONE- WAY* ANOVA *post hoc* Tukey. * meio *versus* LPS ou LPS + extratos; # LPS *versus* LPS + extratos.

5.2.5 Dose única do extrato hidro alcoólico de *A. colubrina var. colubrina* não é toxica

Após comprovarmos que *in vitro* o extrato não é toxico, passamos a analisar a toxicidade *in vivo,* empregando alta dose administrada uma única vez. O protocolo utilizado para avaliação da toxicidade aguda foi o preconizado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), método de ensaio 423 (TG 423). O teste de toxicidade de dose única demonstrou que a administração oral de uma dose única extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* na concentração de 300 mg/kg, 2000 mg/kg ou 5000 mg/kg de (n = 3) não induziu nenhuma alteração perceptível, indicando não serem toxicas (queda de peso ou redução no consumo de água e comida, por exemplo), e nem induziram mortalidade nos animais tratados durante o período de observação que foi de 14 dias. Os dados estão mostrados na Tabela 3. Além disso, os parâmetros bioquímicos (Figura 21), hematológicos (Figura 22) e a histopatologia (Figura 23) do fígado, rins e baço dos camundongos não mostraram nenhum efeito adverso. Durante todo o período do estudo foi anotado diariamente o peso, o consumo de água e ração dos animais, para análise da avaliação ponderal ou possíveis alterações no comportamento alimentar.

	Média de peso ganho (g)/grupo (n = 3)		Alimento consumido (g)/grupo (n = 3)		Água consumida (mL)/grupo (n = 3)	
DOSES	DIA 1	DIA 14	DIA 1	DIA 14	DIA 1	DIA 14
300 mg/kg	20,64 ± 1,76	20,86 ± 1,32	350	165	450	223,4
2000 mg/kg	21,30 ± 0,60	21,42 ± 0,23	350	169	450	224,0
5000 mg/kg	21,20 ± 0,62	21,33 ± 0,64	350	162	450	220,3

Tabela 3 – Dose única do extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* não alterou o consumo de alimento e água e nem o peso dos animais. Os animais (n = 3), receberam, por gavagem, uma única dose de extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* diluído em água e nas concentrações de 300, 2000 ou 5000 mg/kg. Os animais foram observados por 14 dias. Durante este período os animais foram pesados e as quantidades de comida e água consumidas foram registradas. O método utilizado neste ensaio foi o TG 423 (OECD). Análise estatística realizada pelo *Teste t- student pareado*, com p < 0,05, não demonstrou diferenças significativas.

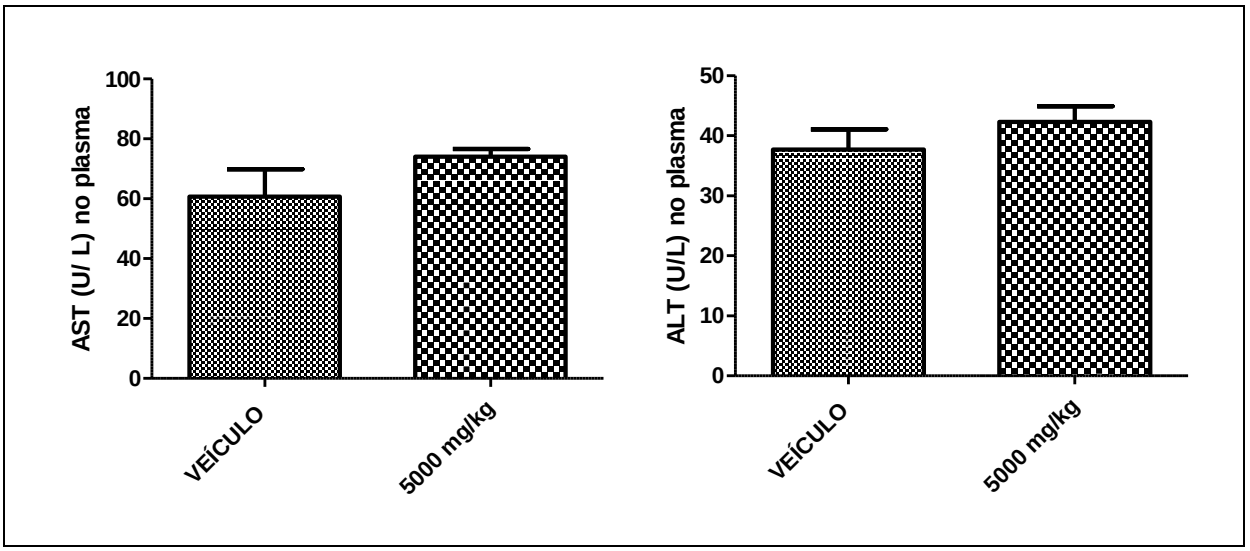


Figura 21. Dose única do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* não foi tóxica para camundongos. . Um grupo de animais (n = 3), recebeu, por gavagem, a dose de 5000 mg/kg do extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* administrada uma única vez. O extrato foi diluído em água e os animais observados por 14 dias. Após este período os animais foram eutanasiados para coleta de sangue e obtenção de plasma que foram utilizados para quantificação das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Análise estatística realizada pelo *Teste t-student não paramétrico*, não demonstrou diferenças significativas.

Na figura 22 observamos que o tratamento com doses únicas de 300, 2000 ou 5000 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* não modificou o número de leucócitos circulantes.

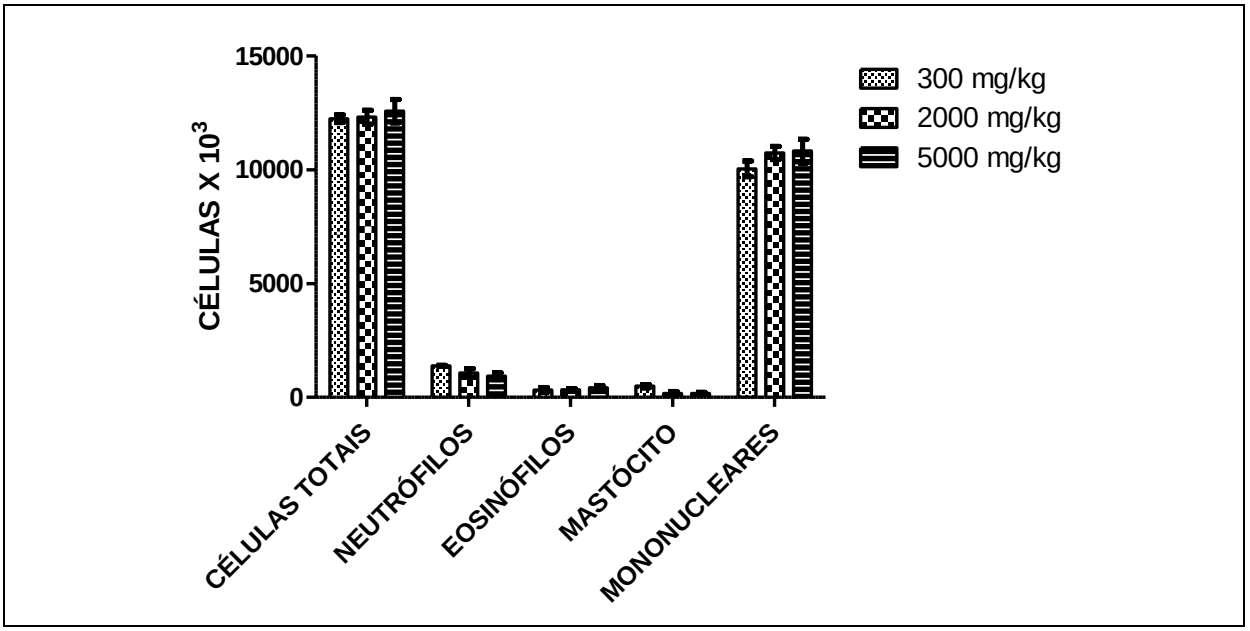


Figura 22. Dose única do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* não alterou o número de leucócitos circulantes. Os camundongos (n = 3) foram divididos em três grupos e

receberam, por gavagem, uma única dose de extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* diluído em águanas concentrações de 300, 2000 ou 5000 mg/kg e foram observados por 14 dias. Após este período os animais foram eutanasiados e o esfregaço sanguíneo foi corado com Panótico Rápido para contagem diferencial das células. Análise estatística realizada pelo teste *TWO WAY* ANOVA, com $p < 0,05$.

A análise histológica não revelou alterações significativas no rim, fígado e baço dos animais (Figura 23) que receberam dose única do extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* na concentração de 5000 mg/kg, por gavagem. Para analisarmos as alterações comparamos o grupo tratado com dose única do extrato com o grupo que recebeu apenas água no ensaio de toxicidade de doses repetidas, uma vez que o protocolo utilizado na avaliação da toxicidade aguda (OECD TG 423) não preconiza grupo controle.

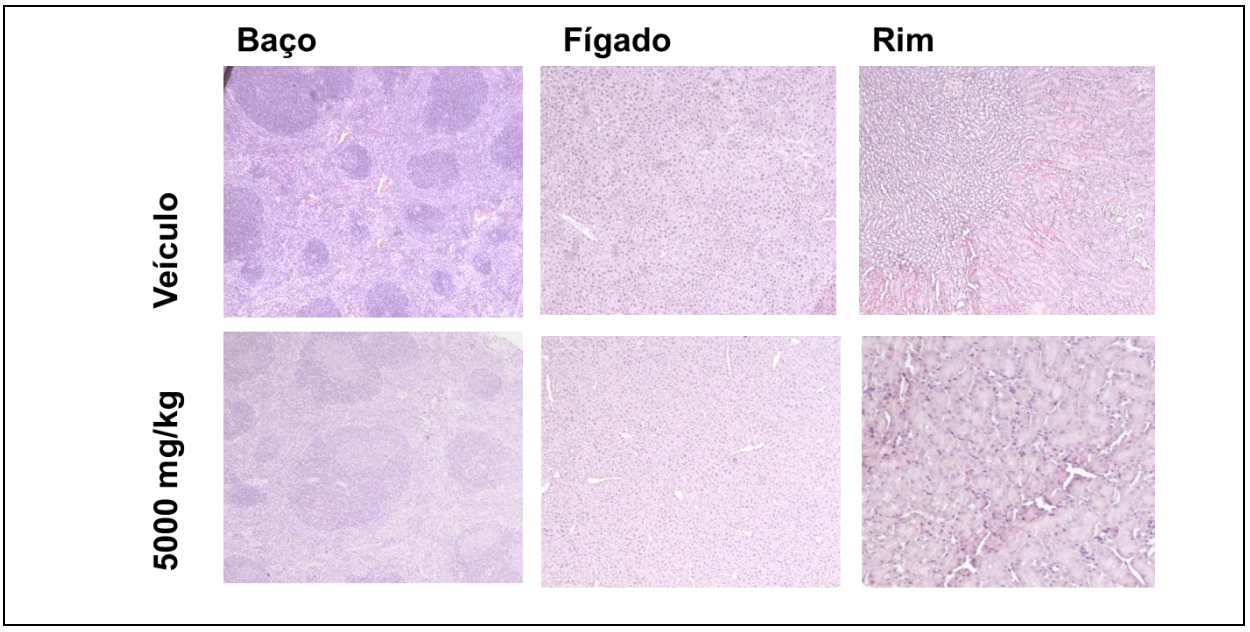


Figura 23. Dose única do extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* não alterou a estrutura microscópica dos órgãos. Rim, fígado e baço foram coletados dos animais do grupo que recebeu apenas água (veículo) e do grupo tratado com o extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* em dose única na concentração de 5000 mg/kg por gavagem. Coloração em Hematoxilina/Eosina. Microscópio óptico. Imagens dos rins, fígado e baço: 100 X.

5.2.6 Doses repetidas do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* não induzem efeitos tóxicos

Para os ensaios realizados com doses repetidas utilizamos o protocolo recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - *GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE TOXICOLOGIA E SEGURANÇA*

FARMACOLÓGICA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS (ANVISA, 2013). As doses utilizadas para avaliação da toxicidade foram 300 ou 1000 mg/kg de extrato de *A. colubrina* var. *colubrina*, duas vezes ao dia (12/ 12h) por 14 dias. Os resultados deste teste não revelaram quaisquer sinais de sinais de toxicidade (queda de peso ou redução no consumo de água e comida, por exemplo) e não induziu mortalidade durante os 14 dias de observação (Tabela 4). Diferente dos resultados obtidos com o extrato de *T. argentea*, não observamos ganho de peso nos animais de ambos os sexos. Os parâmetros bioquímicos (Figura 24), hematológicos (Figura 25) e a histopatológicos (Figura 26) do fígado, rins e baço dos camundongos não apresentaram nenhuma alteração perceptível.

			CONTROLE	**300 mg/kg**	**1000 mg/kg**
Machos	Média de peso ganho (g)/grupo (n = 4)	DIA 1	24,24 ± 2,45	24,98 ± 1,94	25,10 ± 2,18
		DIA 14	24,39 ± 1.97	25,11 ± 2,01	25,39 ± 2,01
	Alimento consumido (g)/grupo (n = 4)	DIA 1	350	350	350
		DIA 14	233	239	242
	Água consumida (mL) /grupo (n = 4)	DIA 1	350	350	350
		DIA 14	217	221	216
Fêmeas	Média de peso ganho (g)/grupo (n = 4)	DIA 1	20,86 ± 0,63	21,50 ± 0,60	21,64 ± 1,12
		DIA 14	21,03 ± 0,32	21,93 ± 0,25	21,92 ± 0,88
	Alimento consumido (g)/grupo (n = 4)	DIA 1	350	350	350
		DIA 14	214	210	212
	Água consumida (mL) /grupo (n = 4)	DIA 1	350	350	350
		DIA 14	211	216	213,4

Tabela 4. Doses repetidas do extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* não modificaram o consumo de alimento e água, e nem o peso dos animais. Os animais divididos em macho (n = 4) e fêmea (n = 4), receberam, por gavagem, a cada 12 horas por 14 dias, as doses de 300 e 1000 mg/kg extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* diluído em água. Animais tratados apenas com água (veículo) no mesmo esquema, foram empregados como controle. Durante este período, os animais foram pesados e a quantidade de comida e água foram registradas. O protocolo utilizado neste ensaio é o preconizado pela ANVISA (2013). Análise estatística por *ONE- WAY* ANOVA, $p < 0,05$

A Figura 24, mostra que a maior dose do extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* não aumentou a concentração circulante de AST/ ALT quando comparado com os valores obtidos nos animais controles.

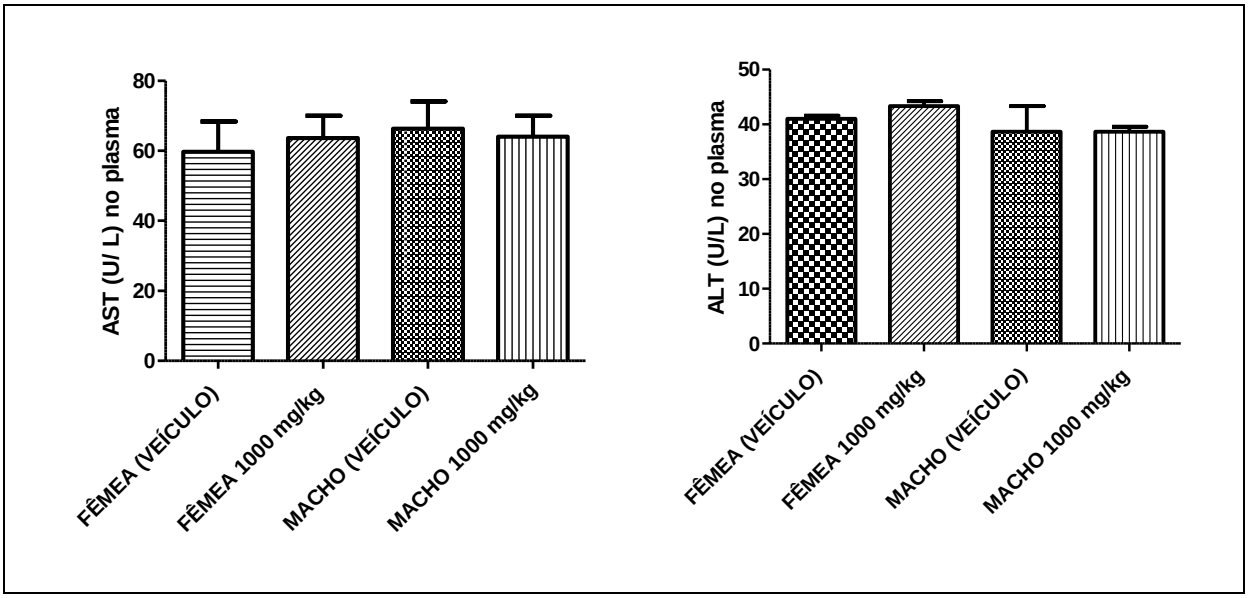


Figura 24. Doses repetidas do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* não foram tóxicas para camundongos. Os animais (n = 4),receberam, por gavagem, água (veículo) ou dose de 1000 mg/kg do extrato de *A. colubrina var. colubrina* diluído em água de 12 em 12 horas durante 14 dias. Após este período os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para quantificação no plasma das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Análise estatística realizada por ONE- WAY ANOVA, *pot hoc* Tukey com $p < 0,05$ considerado significativo. *veículo *versus*

Na figura 25 observamos que o tratamento com doses repetidas de 300 ou 1000 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* não modificou o número de leucócitos circulantes.

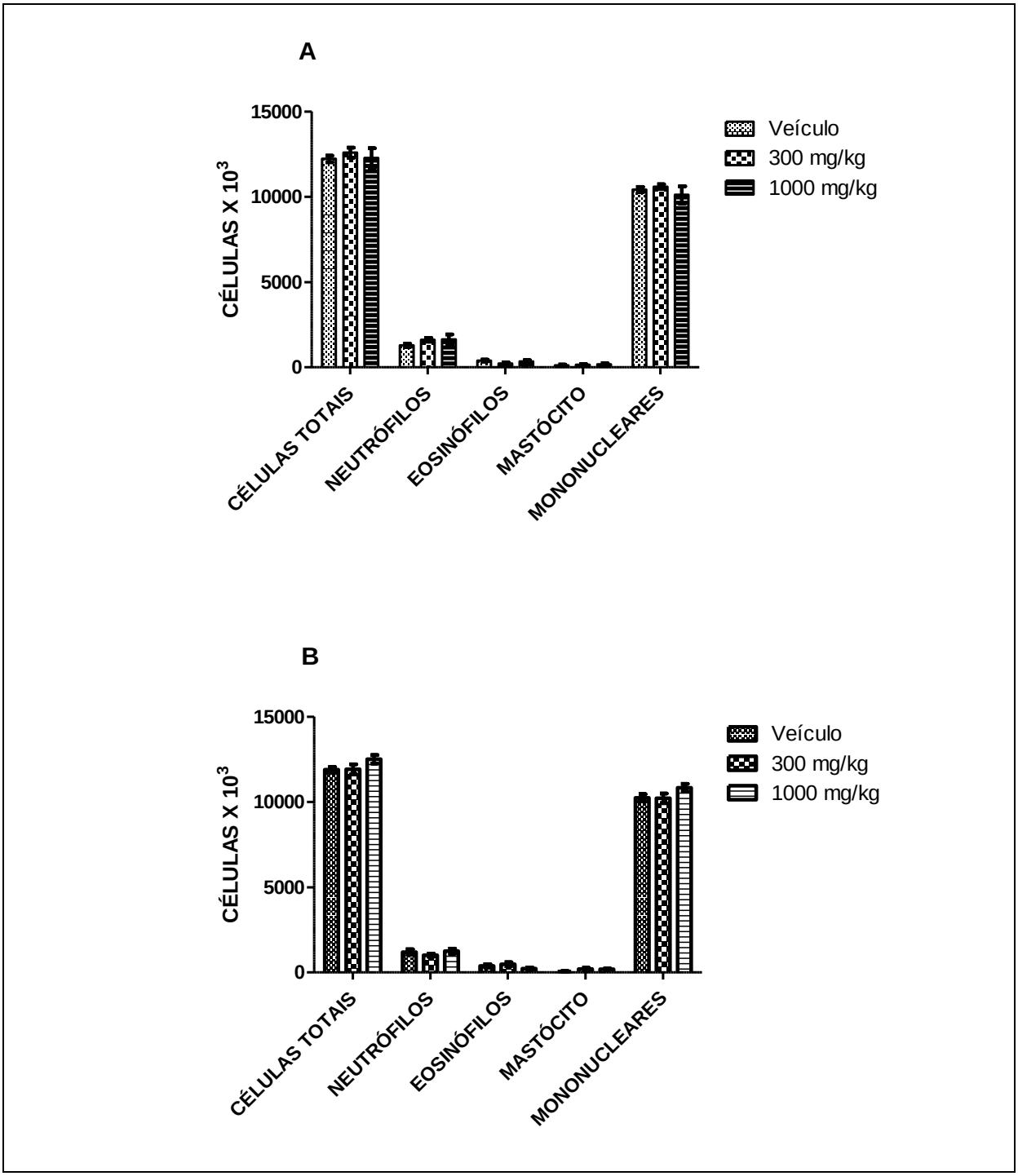


Figura 25. Doses repetidas do extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* não alteraram o número de leucócitos circulantes. Os animais (n = 4) macho (A) e fêmea (B) foram divididos em três grupos e receberam, por gavagem, a cada 12 horas água (veículo) ou as doses de 300 e 1000 mg/kg de extrato de *A. colubrina var. colubrina,* por 14 dias. Após este período os animais foram eutanasiados e sangue coletado para determinar o número total (solução de Turk) e diferencial dos leucócitos empregando esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido. Análise estatística realizada pelo teste *TWO WAY* ANOVA. Não foram encontradas diferenças significativas.

.

A análise histológica não revelou alterações significativas no rim, fígado e baço dos animais (Figura 26) que receberam as doses do extrato de *A. colubrina*

var. *colubrina* de 300 ou 1000 mg/kg, por gavagem, durante 14 dias.

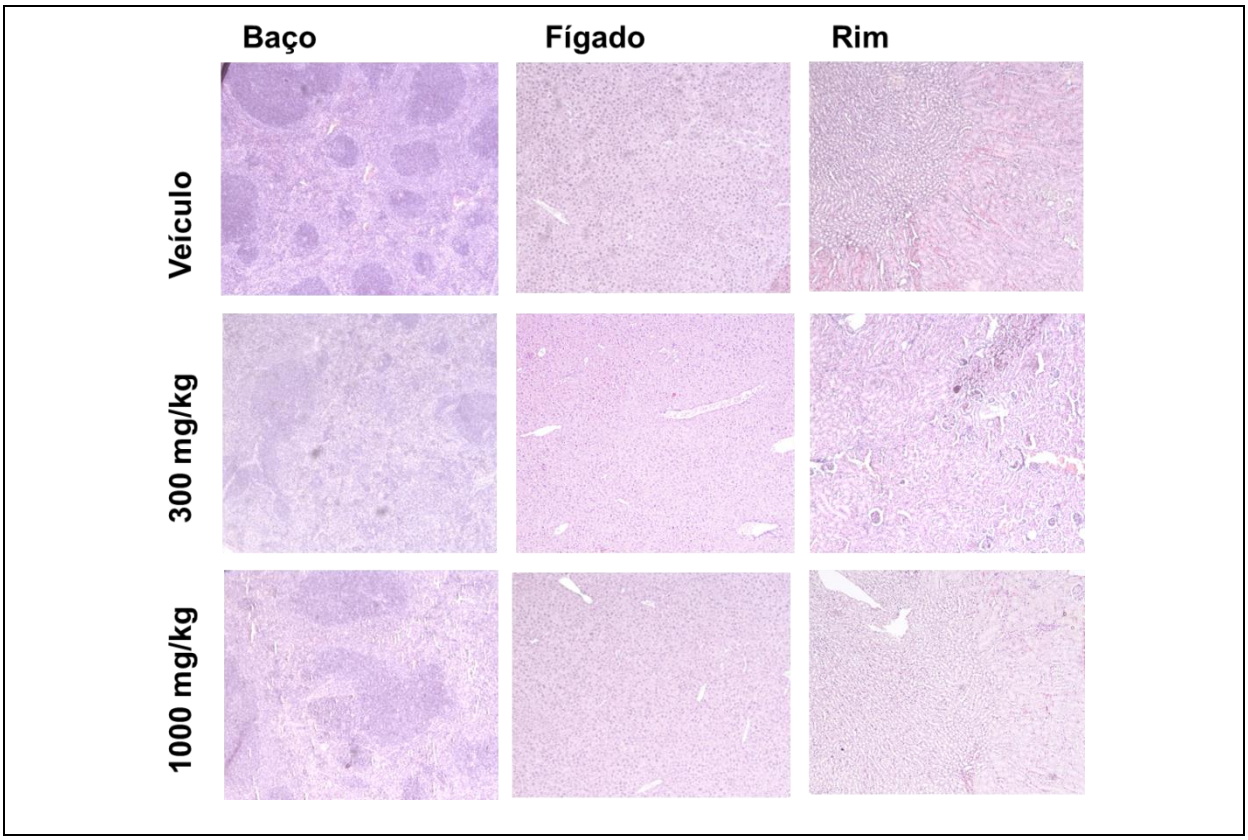


Figura 26. Doses repetidas do extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* não alterou a estrutura microscópica dos órgãos. Rim, fígado e baço foram coletados dos animais que receberam apenas água (veículo) ou o extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* em doses repetidas de 300 ou 1000 mg/kg, por gavagem. Coloração em Hematoxilina/Eosina. Microscópio óptico. Imagens dos rins, fígado e baço: 100 X.

5.2.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato de *A. colubrina* var. *colubrina*

Após definir as doses que seriam utilizadas, nosso próximo passo foi avaliar o potencial anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina.* O modelo de inflamação utilizado foi a bolha de ar inoculada com LPS. Como mostrado nas Figuras 27 e 28, os animais que receberam apenas o extrato na dose de 300 mg/kg não apresentaram alterações na concentração de proteínas e de células recuperadas da cavidade. Animais que receberam LPS tiveram aumento significativo na concentração de proteínas extravasadas e no numero de células recuperadas no exsudato inflamatório (controle positivo). O tratamento com extrato nas doses 5, 60 ou 300 mg/kg reduziram a concentração de proteínas (Figura 27) e

o aumento de neutrófilos induzidos na bolha pela inoculação de LPS. Apenas a dose de 125 mg/kg inibiu significativamente o recrutamento de eosinófilos e células mononucleares presentes na bolha induzida pelo LPS (Figura 28).

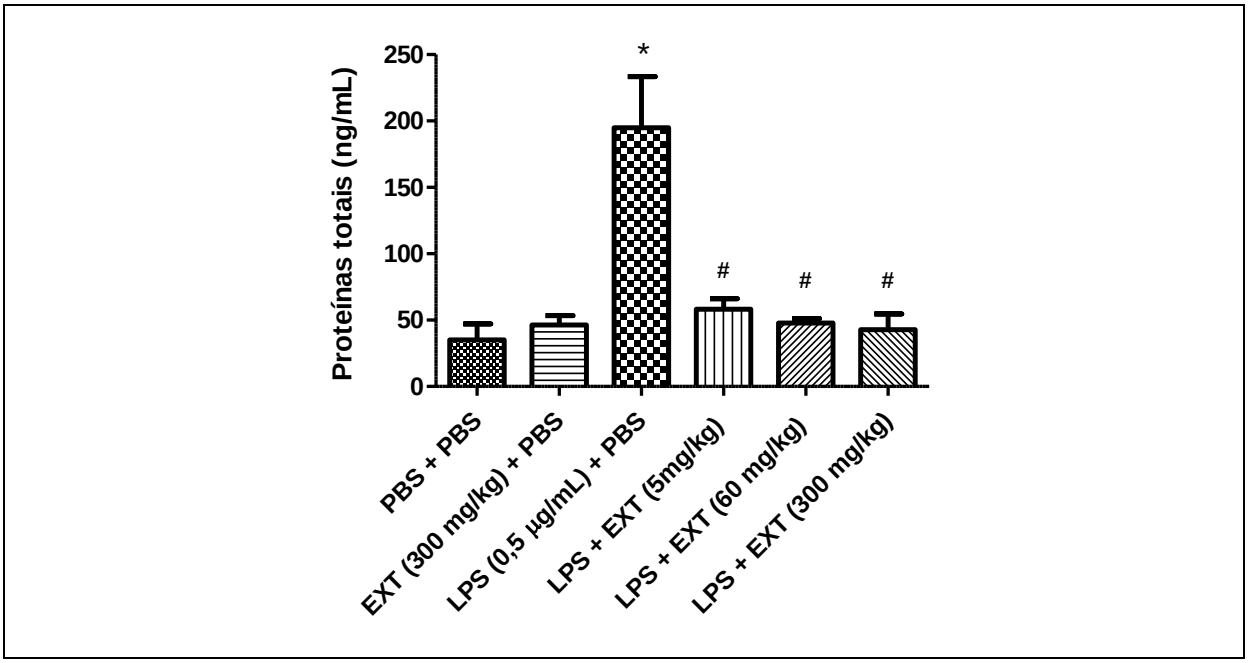


Figura 27. O extrato de *A. colubrina var. colubrina* inibiu o edema induzido por LPS . Os camundongos foram divididos em grupos (n = 8) que receberam no interior da bolha de ar apenas PBS (PBS + PBS); apenas extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* (300 mg/kg) e PBS (EXT+ PBS); LPS (0,5 μg/mL) e PBS (LPS + PBS); e LPS (0,5 μg/mL) e 1 hora depois o extrato nas concentrações de 5, 60 ou 300 mg/kg (LPS + EXT). Após 4 horas, do tratamento com os extratos os animais foram eutanasiados, as cavidades lavadas com PBS heparinizado. A concentração de proteínas foi determinada pela reação de Bradford. Diferenças estatísticas empregando *ONE- WAY ANOVA,* teste *post hoc* Tukey. significativos $p < 0,05$. *PBS + PBS *versus* LPS + PBS; #LPS + PBS *versus* LPS + EXT.

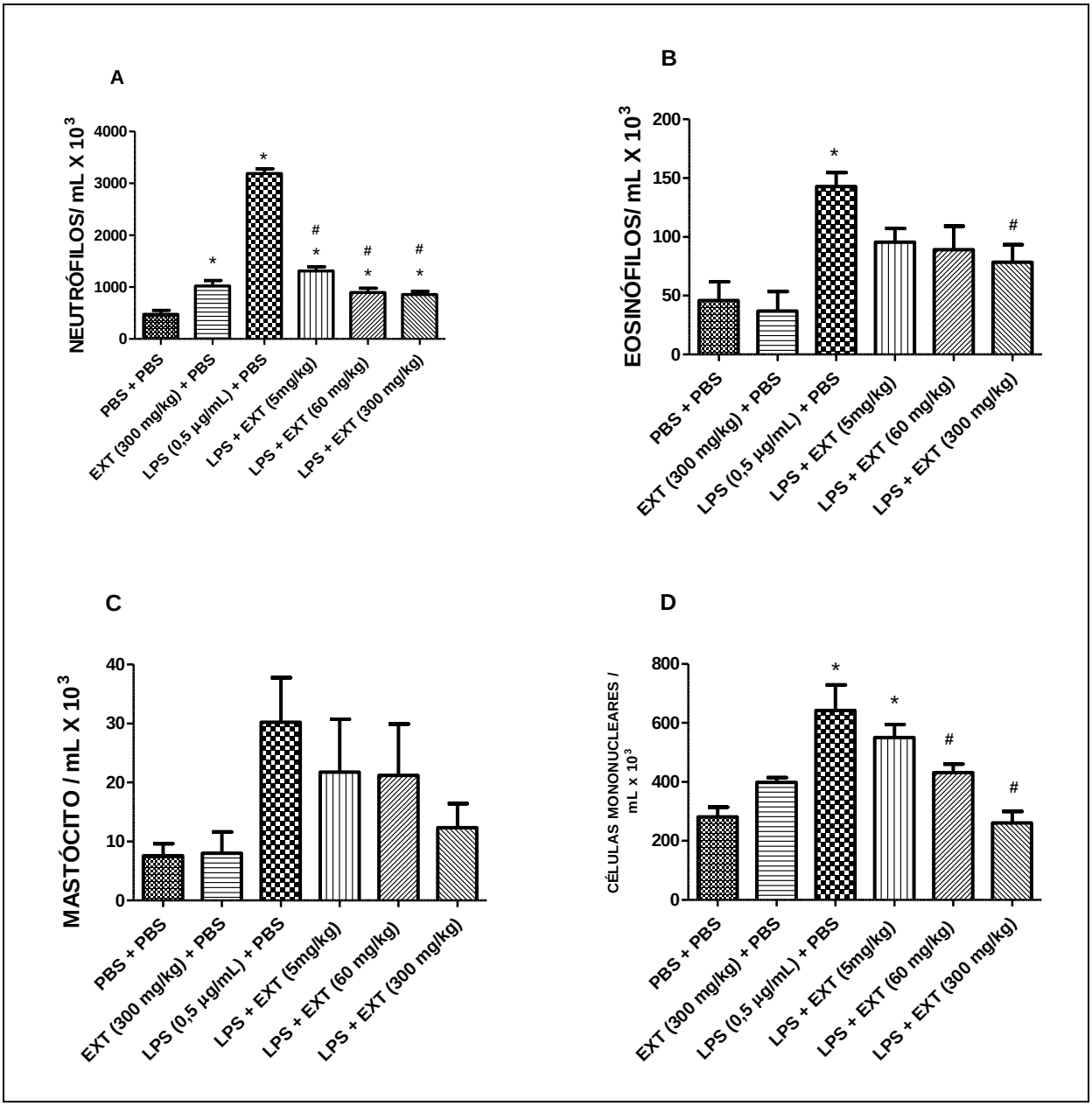


Figura 28. O extrato de *A. colubrina* var. *colubrina* inibiu o recrutamento celular induzido por LPS. Os camundongos (n = 8) receberam no interior da bolha de ar apenas PBS + PBS; PBS e extrato hidroalcoólico de *A. colubrina var. colubrina* (300 mg/kg) (EXT + PBS); LPS (0,5 μg/mL) e PBS (LPS + PBS); e LPS (0,5 μg/mL) e 1 hora depois o extrato (LPS + EXT) nas concentrações de 5, 60 ou 300 mg/kg. Após 4 horas, do tratamento com os extratos os animais foram eutanasiados, a cavidade foi lavada com PBS heparinizado. O recrutamento celular foi determinado pela contagem total e diferencial de neutrófilos (A), eosinófilos (B), mastócitos (C) e células mononucleares (D). Diferença estatística empregando *ONE- WAY ANOVA,* teste *post hoc* Tukey. *p < 0,05. Foram considerados significativos p < 0,05. *PBS + PBS *versus* LPS + PBS; #LPS + PBS *versus* LPS + EXT.

Como observamos que o extrato inibiu a inflamação induzida por LPS, o próximo passo foi quantificar as citocinas presentes nos lavados das bolhas de ar, empregando o ensaio imunoenzimático (ELISA). Como demonstra a Figura 31, o LPS induziu a liberação de IL-6, IL-1β, e TNF-α, mas não de IL-10. No entanto,

somente o tratamento da bolha inflamada com o extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* nas concentrações de 5, 60 ou 300 mg/kg inibiu significativamente a liberação das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF-α e aumentou a produção de IL-10 (citocina anti-inflamatória) quando comparadas a bolha com apenas LPS (controle positivo). Apenas as concentrações de 60 e 300 mg/kg inibiram IL-1β (quando comparadas ao LPS). Além disso, o extrato na maior concentração aumentou a produção de IL-10 mesmo na ausência de LPS.

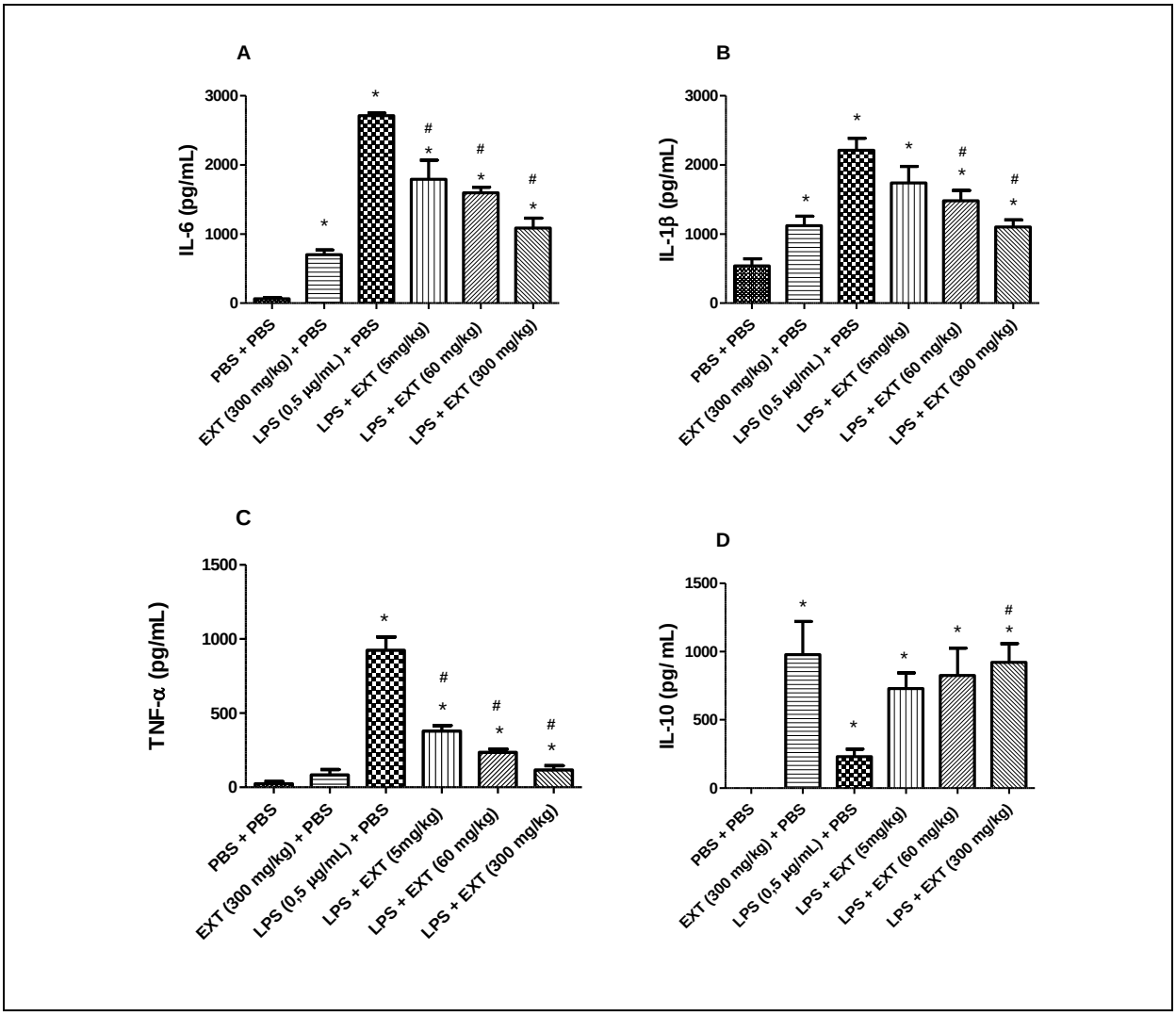


Figura 29 - O extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* alterou a concentração de citocinas na bolha dos camundongos que receberam LPS. Os camundongos foram divididos em grupos (n = 4) e receberam no interior da bolha de ar PBS + PBS; PBS e extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* var. *colubrina* (300 mg/kg) (EXT + PBS); LPS (0,5 µg/mL) e PBS (LPS + PBS); LPS (0,5 µg/mL) e 1 hora depois os extratos (LPS + EXT) nas concentrações de 5, 60 ou 300 mg/kg. Após 4 horas do tratamento com o extrato os animais foram eutanasiados, a cavidade lavada com PBS heparinizados. As concentrações das citocinas indicadas foram determinadas por ELISA. Diferença estatística empregando *ONE- WAY ANOVA,* teste *post hoc* Tukey, foram consideradas com $p < 0,05$. * PBS *versus* LPS, # LPS *versus* LPS + EXT.

“Todas as coisas, na Terra, passam... Os dias de dificuldades,
as frustrações que nos fazem chorar um dia passarão.
Assim, façamos a nossa parte, o melhor que pudermos,
sem esmorecimento e confiemos em Deus,
aproveitando cada segundo, cada minuto que,
por certo, também passarão..."
Emmanuel

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O uso popular de plantas na medicina tradicional é uma grande fonte para descoberta de novos agentes terapêuticos. Dentre os fatores que estimulam o uso das espécies vegetais pelas populações, está a crença popular de que o natural é inofensivo, a dificuldade na compra de medicamento por seu elevado custo ou, ainda, os efeitos colaterais causados pelos medicamentos alopáticos (RATES, 2001). Por isso o conhecimento popular deve estar associado a bioensaios para que se conheça os mecanismos de ação e a eficácia das plantas no tratamento de doenças. Fatores relevantes como a identificação botânica correta das espécies vegetais e as condições ambientais que estes vegetais estão expostos, devem ser considerados. Sabe- se que muitas plantas apresentam substâncias que provocam reações adversas e poucos são os estudos toxicológicos realizados com as espécies comumente utilizadas (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006) e que fatores ambientais, como a sazonalidade climática, por exemplo, interferem na produção de metabólitos secundários em determinadas espécies (PAIVA *et al.*, 2002; MONTEIRO *et al.*, 2006).

As *T. argentea* Mart. & Succ e da *A. colubrina var. colubrina* (Benth.) Brenan, conhecidas popularmente como capitão do campo e angico vermelho respectivamente, são muito utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias do trato respiratório. No entanto, são poucos os estudos científicos demonstrando as propriedades farmacológicas e os mecanismos de ação das mesmas. Neste estudo demonstramos que ambas as plantas não são toxicas para macrófagos *in vitro*, e nem para camundongos *in vivo*. Empregando dois protocolos preconizados pelos órgãos regulamentadores, o de dose única (TG 423 OECD, 2001) e o de múltiplas doses (ANVISA, 2001), mostramos que mesmo em doses tão altas quanto 1000 e 5000 mg/kg, nenhum dos dois extratos hidroalcoólico alterou o numero de leucócitos circulantes, nem induziu lesões hepáticas ou em outros tecidos. Os ensaios de citotoxicidade também foram fundamentais para determinarmos as concentrações e doses a serem empregadas para as avaliações subsequentes da capacidade destas plantas em inibirem a liberação de NO e citocinas inflamatórias de macrófagos *in vitro* e a inflamação *in vivo*, respectivamente.

Nossos dados mostraram que, embora com diferentes magnitudes e concentrações, os extratos hidroalcoólico de *T. argentea* e *A. colubrina* var. *colubrina* inibiram *in vitro* e *in vivo* a produção de IL-6, TNF-α, IL-1β *e* NO, induzidos pelo LPS, e por mecanismos possivelmente relacionado com a inibição de NF-kB, um fator de transcrição envolvido na indução de citocinas inflamatórias. Além disto, ambos os extratos reduziram a exsudação de proteínas, demonstrando que também inibem o aumento da permeabilidade vascular, e consequentemente o edema. As citocinas IL-6, TNF-α e IL-1β são classicamente conhecidas por induzirem o recrutamento celular (ZUCALI, *et al,* 1986; DEJANA *et al.,*1987; ZHANG *et al*.,1988) e o edema (WILLIAMS & PECK, 1977), e por isto são denominadas de citocinas inflamatórias (EDWARDS *et al.*, 2006, NEWTON & DIXIT, 2012). Além disso, os extratos aumentaram a liberação de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, capaz de inibir a produção de citocinas inflamatórias (LAWRENCE *et al.,* 2001; KWILASZ *et al.*, 2014), o recrutamento celular (SPERTINI, 1996) e o edema (WILLIAMS & PECK,1977).

O NO é um mediador que embora essencial para indução da morte de microrganismos (FANG, 2004) quando em excesso também leva ao dano tecidual (BAUGHMAN *et al*., 1996; CHEN, *et al.*, 2003). Embora existam artigos mostrando que extratos hidroalcoólicos de outras espécies vegetais, entre elas a *Arnica montana* também inibem a produção de NO (VERNA *et al.* ,2009), este é o primeiro relato que *T. argentea* e *A. colubrina* var. *colubrina* apresentam efeitos semelhantes. Com base em nossos dados podemos concluir que a atividade anti-inflamatória tanto da *T. argentea* como da *A. colubrina* var. *colubrina* ocorrem por dois mecanismos, inibição de NO e citocinas inflamatórias, e indução de citocina anti-inflamatória.

Outras plantas do gênero *Terminalia* já são conhecidas pelas suas atividades biológicas significativas. A *T. catappa* é antioxidante, hepatoprotetora (LIN *et al.*, 1997) e antimicrobiana (NAIR & CHANDA, 2008); a *T. bellerica* previne a arteriosclerose, tem atividades antimalárica e antifúngica (SHAILA *et al.*, 1995); a *T. arjuna* também previne alterações das arteriais coronarianas (DWIVEDI & JAUHARI, 1997), tem atividade anti-inflamatória, imunomoduladora e antinociceptiva (HALDER *et al.*, 2009), sendo o ácido elágico identificado como um dos componentes biologicamente ativos em *T. arjuna* (KAUR *et al.*, 1997) e triterpenos, lignanas e flavonas na *T. argentea* (GARCEZ *et al.*, 2003).

O gênero Terminalia é conhecido como uma rica fonte de triterpenos, flavonóides, taninos e outros compostos aromáticos (HONDA *et al*., 1976; VALSARAJ *et al.*, 1997; KANDIL *et al*., 1999). Estudos comprovam que os triterpenos foram capazes de reduzir a reação inflamatória em modelos de inflamação aguda e crônica (SAFAYHI & SAILER, 1997; BANNO *et al.*, 2006), como exemplo o ácido boswellico que inibe a ação da 5-lipoxigenase, a enzima responsável pela biossíntese de leucotrienos durante a inflamação (SAFAYHI & SAILER, 1997; SCHWEIZER *et al*., 2000). O ácido elágico é um polifenol conhecido pelas suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias como demonstrado anteriormente pelo nosso grupo (ROGÉRIO *et al.* 2009, ALVES *et al*, 2013; FAVARIN *et al*., 2013).

Espécies da família *Anadenanthera* já são conhecidas pelas suas atividades biológicas relevantes. Extrato de *A. colubrina* var. *cebil* induz a cicatrização de lesões em pele de ratos (PESSOA *et al.*, 2015), possui atividade antimicrobiana e antiproliferativa (DAMASCENA *et al*., 2014), é anti-inflamatório e nociceptivo em modelos de roedores (SANTOS *et al.*, 2013). O composto biologicamente ativo isolado de plantas desta família foi o ácido heteropolissacarídeo (ARAGAL) que ativa de macrófagos peritoneais (MORETAO *et al*., 2003; MORETAO *et al.*, 2004) e inibe a ativação das lipoxigenases 12 e 15 (GUTIERREZ-LUGO, 2003).

Embora a inflamação seja essencial para a manutenção da homeostase tecidual, proteção contra agentes infecciosos e indução da resposta imune adaptativa, quando não controlada pode resultar em dano tecidual, como ocorre na artrite reumatóide (STROBER & HOLOSHITZ, 1990), dano agudo dos pulmões (ALI) (SHEN *et al.*, 2009), choque séptico (SUZUKI, 1963), doença do soro (EHRICH *et al.* , 1948). Nestas doenças, o intenso infiltrado celular, é constituído principalmente de neutrófilos que são as primeiras células de defesa recrutadas, mas que se persistentes podem levar ao dano tecidual (BAUGHMAN *et al*., 1996). Além disso, em patologias como acidentes escorpiônicos (ZOCCAL *et al*., 2016), injuria aguda dos pulmões (ALI) (SHEN *et al.*, 2009), síndrome da insuficiência respiratória aguda (ARDS) (MATTHAY *et al.*, 2012), o edema pulmonar pode levar o individuo à morte, devido a dificuldade de oxigenação. Assim, a procura por novos agentes terapêuticos que inibam o edema, é de extrema relevância.

Nossos resultados mostraram que ambos os extratos mesmo quando administrados em protocolos terapêuticos, inibem a liberação de citocinas inflamatórias, o recrutamento celular, especialmente de neutrófilos, e o edema. Estes resultados são extremamente animadores, e assim, podemos sugerir que os extratos de *T. argentea* e de *A. colubrina* var. *colubrina* têm potencial para serem empregados na formulação de novos fármacos para terapia de doenças inflamatórias, pulmonares ou não.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os nossos resultados demonstram que os extratos hidroalcoólicos de *Terminalia argentea* Mart. & Succ e de *Anadenanthera colubrina* var. *colubrina* (Benth.) Brenan, não são tóxicos, e têm potente ação anti-inflamatória, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

“Há quem diga que todas as noites são de sonhos.
Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão.
No fundo, isto não tem muita importância.
O que interessa mesmo não é a noite em si, são os sonhos.
Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares,
em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado.”

William Shakespeare

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI J.D., BENSEN, W.G., HODSMAN, A.B. Corticosteroid-induced osteoporosis. **Semin Arthritis Rheum**. p.375-84, Jun;22(6) 1993.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2013). Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Guia%2Bde%2BEstudos%2BN%25C3%25A3o%2BCl%25C3%25ADnicos%2B-%2Bvers%25C3%25A3o%2B2.pdf/0afb3f3b-7a32-4232-a7e2-de8ef460c9f7>HTM. Acesso em 01 mar. 2017.

AKKOL, E. K., DAS, S., SARKER, S. D., NAHAR, L. The treatment of inflammation, pain, and Fever using medicinal plants. **Adv Pharmacol Sci**, 476985, 2012.

ALVES, C. F, ANGELI, G. N., FAVARIN, D. C., ANDRADE, E.L., CHICA, J. E. L., FACCIOLI, L. H., SILVA, P. R., ROGERIO, A. P. The Effects of Proresolution of Ellagic Acid in an Experimental Model of Allergic Airway Inflammation. **Mediators Inflamm**. 2013: 863198. 2013.

ALTSCHUL, S.R. A Taxonomic Study Of The Genus *Anadenanthera*. **Gray Herb. of Harvard Univ.**, 193, pp. 3-65, 1964.

ANNANE, D. Adrenal insufficiency in sepsis. **Curr Pharm Des** 14(19): 1882-1886, 2008.

ARCANGELI, M. L., FRONTERA, V., AURRAND-LIONS, M. Function of junctional adhesion molecules (JAMs) in leukocyte migration and homeostasis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)** 61(1): 15-23, 2013.

BARNES, C. J., CAMERON,I. L., HARDMAN, W. E., LEE, M. Non-steroidol anti-inflammatory drug effect on crypt cell proliferation and apoptosis during initiation of rat colon carcinogenesis. **Br J Cancer** 77(4): 573-580, 1998.

BARNES, S. A., MALLINCKRODT, C. H., LINDBORG, S. R., CARTER, M. K. The impact of missing data and how it is handled on the rate of false-positive results in drug development. **Pharm Stat** 7(3): 215-225, 2008.

BARRETO, H. M., COELHO, K. M., FERREIRA, J. H., DOS SANTOS, B. H., DE ABREU, A. P., COUTINHO, H. D., DA SILVA, R. A., DE SOUSA, T. O., CITO, A. M., LOPES, J. A. Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by extracts from Anadenanthera colubrine (Vell.) Brenan var. cebil against multi-drug resistant bacteria. **Nat Prod Res** 30(11): 1289-1292, 2016.

BAUGHMAN, R. P., GUNTHER, K. L., RASHKIN, M. C., KEETON, D. A., PATTISHALL, E. N. Changes in the inflammatory response of the lung during acute respiratory distress syndrome: prognostic indicators. **Am J Respir Crit Care Med**. 154(1):76-81. Jul; 1996.

BISWAS, S. K., MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol** 11(10): 889-896, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72: 248-254, 1976.

BUCKLEY, C. D., GILROY, D. W., SERHAN,C. N., STOCKINGER, B., TAK, P. P. The resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol** 13(1): 59-66, 2013.

BUTCHER, E. C. Leukocyte–endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity.**Cell** 67, 1033–1036 (1991).

CALIXTO, J. B., SCHEIDT, C., OTUKI, M., SANTOS, A. R. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opin Emerg Drugs** 6(2): 261-279, 2001.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J Ethnopharmacol** 100(1-2): 131-134, 2005.

CAPASSO, R., IZZO, A.A., PINTO, L., BIFULCO, T., VITOBELLO, C., MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia** 71:S58-S65, 2000.

CELOTTI, F., LAUFER, S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. **Pharmacol Res** 43(5): 429-436, 2001.

CHEN, T., ZAMORA, R., ZUCKERBRAUN, B., BILLIAR, T.R. Role of nitric oxide in liver injury. **Curr Mol Med.** 3(6):519-26. Sep; 2003.

CHISTIAKOV, D. A., OREKHOV, A. N., BOBRYSHEV, Y. V. LOX-1-Mediated Effects on Vascular Cells in Atherosclerosis. **Cell Physiol Biochem 38**(5): 1851-1859, 2016.

CLAES, A. K., J. Y. ZHOU AND D. J. PHILPOTT. NOD-Like Receptors: Guardians of Intestinal Mucosal Barriers. **Physiology** (Bethesda) 30(3): 241-250, 2015.

CREMINON, C., HABIB, A., MACLOUF, J., PRADELLES, GRASSI, P. J., FROBERT, Y. Differential measurement of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase expression in human umbilical vein endothelial cells using specific immunometric enzyme immunoassays. **Biochim Biophys Acta** 1254(3): 341-348, 1995.

DAMASCENA, N. P., SOUZA, M. T., ALMEIDA, A. F., CUNHA, R. S., DAMASCENA, N. P., CURVELLO, R. L., LIMA, A. C., ALMEIDA, E. C., SANTOS, C. C., DIAS, A. S., PAIXAO, M. S., SOUZA, L. M., QUINTANS JUNIOR, L. J., ESTEVAM, C. S., ARAUJO, B. S. Antioxidant and orofacial anti-nociceptive activities of the stem bark aqueous extract of Anadenanthera colubrina (Velloso) Brenan (Fabaceae). **Nat Prod Res** 28(10): 753-756, 2014.

DEJANA, E., JI-MING, W., MANTOVANI, A. The recruitment of leukocytes and their interaction with the vessel wall: the role of interleukin-1 and tumor necrosis factor. **Scand J Rheumatol Suppl.**66:19-25. 1987.

DOSTERT, A., HEINZEL, T. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. **Curr Pharm Des** 10(23): 2807-2816, 2004.

DWIVEDI, S., JAUHARI, R. Beneficial effects of Terminalia arjuna in coronary artery disease. **Indian Heart J** 49(5): 507-510, 1997.

EDWARDS, J. P., ZHANG, X., FRAUWIRTH, K. A., MOSSER, D. M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **J Leukoc Biol** 80(6): 1298-1307, 2006.

EHRICH, W. E., FORMAN, C., SEIFTER, J. Experimental differentiation of pathogenesis of serum sickness, glomerular nephritis, rheumatic fever, and periarteritis nodosa. **Am J Med Sci**. 215(6):713. 1948.

FACCIOLI, L. H., S. NOURSHARGH, R. MOQBEL, F. M. WILLIAMS, R. SEHMI, A. B. KAY AND T. J. WILLIAMS .The accumulation of 111In-eosinophils induced by inflammatory mediators, in vivo. **Immunology** 73(2): 222-227.1991

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. Nat Rev Microbiol. 2(10):820-32. 2004.

FAVARIN, D. C., TEIXEIRA, M. M., ANDRADE, E. L., ALVES, C. F., CHICA, J. E. L. SORGI, C. A., FACCIOLI, L. H., ROGERIO, A. P. Anti-Inflammatory Effects of Ellagic Acid on Acute Lung Injury Induced by Acid in Mice. **Mediat.Inflamm.** 2013.

FIGUEREDO, F. G., FERREIRA, E. O., LUCENA, B. F., TORRES, C. M., LUCETTI, D. L., LUCETT, E. C., SILVA, J. M., SANTOS, F. A., MEDEIROS, C. R., OLIVEIRA, G. M., COLARES, A. V., COSTA, J. G., COUTINHO, H. D., MENEZES, I. R., SILVA, J. C., KERNTOPF, M. R., FIGUEIREDO, P.R., MATIAS, F. Modulation of the antibiotic activity by extracts from Amburana cearensis A. C. Smith and Anadenanthera macrocarpa (Benth.) Brenan. **Biomed Res Int** 2013: 640682, 2013.

FITZGERALD, K. A., O'NEILL, L. A. The role of the interleukin-1/Toll-like receptor superfamily in inflammation and host defence. **Microbes Infect** 2(8): 933-943, 2000.

FRITZ, J. H., FERRERO, R. L., PHILPOTT, D. J., GIRARDIN, S. E. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. **Nat Immunol** 7(12): 1250-1257, 2006.

FRONZA, M., MUHR, C., DA SILVEIRA, D. S., SORGI, C. A., RODRIGUES, S. F., FARSKY, S. H., PAULA-SILVA, F. W., MERFORT, I., FACCIOLI, L. H. Hyaluronidase decreases neutrophils infiltration to the inflammatory site. **Inflamm Res** 65(7): 533-542, 2016.

FUNK, C. D. Leukotriene modifiers as potential therapeutics for cardiovascular disease. **Nat Rev Drug Discov** 4(8): 664-672, 2005.

GARCEZ, F.R., GARCEZ, W.S., MARTIN, M.S., LOPES, F.A. Triterpenoids, lignan and flavans from Terminalia argentea (Combretaceae). Bioch. Syst. and Eco.Vol. 31, 2, p. 229-232, 2003.

GARCIA-RAMALLO, E., T. MARQUES, N. PRATS, J. BELETA, S. L. KUNKEL AND N. GODESSART. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. **J Immunol** 169(11): 6467-6473, 2002.

GERRISTSSEN, M. E. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. Cardiovascular Research, v.32, n.4, p.720-32,1996.

GILLIN, J.C., JACOBS, L.S., FRAM, D.H., SNYDER, F. Acute effect of a glucocorticoid on normal human sleep. **Nature**. 237(5355):398-9. Jun 16, 1972.

GILROY, D. W., LAWRENCE, T., PERRETTI, M., ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov** 3(5): 401-416, 2004.

GOETZL, E. J., PICKETT, W. C. Novel structural determinants of the human neutrophil chemotactic activity of leukotriene B. **J Exp Med** 153(2): 482-487, 1981.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analyses of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p. 131-138, 1982.

GUARIM NETO, G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educaçãoambiental. **Rev. eletrônica Mestr. Educ. Ambient.** v.17, jul-dez, 2006.

GUTIERREZ-LUGO, M. T., DESCHAMPS, J. D., HOLMAN, T. R., SUAREZ, E., TIMMERMANN, B. N. Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of Anadenanthera colubrina. **Planta Med** 70(3): 263-265, 2004.
HALDER, S., N. BHARAL, P. K. MEDIRATTA, I. KAUR AND K. K. SHARMA. Anti-inflammatory, immunomodulatory and antinociceptive activity of Terminalia arjuna Roxb bark powder in mice and rats." Indian J Exp Biol **47**(7): 577-583.

HAYDEN, M. S., GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. **Genes Dev** 18(18): 2195-2224, 2004.

Harling, L., Lambert, J., Ashrafian, H., Darzi, A., Gooderham, N.J., Athanasiou, T. Pre- operative serum VCAM-1 as a biomarker of atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. **J Cardiothorac Surg**. 18;12(1):70, 2017.

KARIN, M., BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. **Annu Rev Immunol** 18: 621-663, 2000.

KAUR, S., GROVER, I. S., KUMAR, S. Antimutagenic potential of ellagic acid isolated from Terminalia arjuna. **Indian J Exp Biol** 35(5): 478-482, 1997.

KWILASZ, A. J., ABDULLAH, R. A., POKLIS, J. L., LICHTMAN, A. H., NEGUS, S. S. Effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on pain-stimulated and pain-depressed behavior in rats. **Behav Pharmacol** 25(2): 119-129, 2014.

LAWRENCE, T., GILROY, D. W., COLVILLE-NASH, P. R., WILLOUGHBY, D. A. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. **Nat Med** 7(12): 1291-1297. 2001.

LEY, K., LAUDANNA, C., C. I., MYRON, NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology** 7, 678-689 (September), 2007.

LIAMINA, S. V., VEDENIKIN, T., BORODOVITSYNA, O. A., KRUGLOV, S. V., MALYSHEV, I. [M1 and M2 macrophage phenotypes functional activity as essential components in innate immune response assessment].**Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova** 98(8): 1030-1035, 2012.

LIN, C. C., CHEN, Y. L., LIN, J. M., UJIIE, T. Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective activity of Terminalia catappa. **Am J Chin Med** 25(2): 153-161, 1997.

LORENZI, H. Árvores brasileiras; Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

MANCUSO, P., STANDIFORD, T. J., MARSHALL, T., PETERS-GOLDEN, M. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of Klebsiella pneumoniae. **Infect Immun** 66(11): 5140-5146, 1998.

MANTOVANI, A., SOZZANI, S., LOCATI, ALLAVENA, M., SICA, P. A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol** 23(11): 549-555, 2002.

MANTOVANI, A., A. SICA, S. SOZZANI, P. ALLAVENA, A. VECCHI AND M. LOCATI. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol** 25(12): 677-686, 2004.

MARNETT, L. J. Mechanisms of cyclooxygenase-2 inhibition and cardiovascular side effects: the plot thickens. **Cancer Prev Res (Phila)** 2(4): 288-290, 2009.

MATHEWS, R. J., SPRAKES, M. B., MCDERMOTT, M. F. NOD-like receptors and inflammation. **Arthritis Res Ther** 10(6): 228, 2008.

MATTHAY, M. A., WARE, L. B., ZIMMERMAN, G. A. The acute respiratory distress syndrome. **J Clin Invest.** 122(8):2731-40.2012.

MCEVER, R. P. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. **Cardiovasc Res** 107(3): 331-339, 2015.

MEDEIROS, A. I., MALHEIRO, A., JOSE, P. J., CONROY, D. M., WILLIAMS, T. J., FACCIOLI, L. H. Differential release of MIP-1alpha and eotaxin during infection of

mice by Histoplasma capsulatum or inoculation of beta-glucan. **Inflamm Res** 53(8): 351-354, 2004.

MEDZHITOV, R. TLR-mediated innate immune recognition. Semin Immunol 19(1): 1-2, 2007.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Enzimas hepáticas: por que são importantes para o estudo de patologias do fígado. **Prática Hospitalar,** Ano IX, n. 51, p. 44-48, 2007.

MIZUGUCHI, J., KAKIUCHI, T., NARIUCHI, H., MATUHASI, T. Different effect of LPS-induced macrophage factor on antibody responses to TI-1 and TI-2 antigens. **Immunology** 47(1): 183-192, 1982.

MOLLER, A. S., OVSTEBO, R, HAUG, K. B., JOO, G. B., WESTVIK, A. B., KIERULF, P. Chemokine production and pattern recognition receptor (PRR) expression in whole blood stimulated with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). **Cytokine** 32(6): 304-315, 2005.

MONTEIRO, J.M., ALBUQUERQUE, U.P., LINS NETO, E.M.F., ARAÚJO, E.L., ALBUQUERQUE, M.M., AMORIN, E.C.L., The effects of seasonal climate changes in the caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Rev. bras. farmacogn**. vol.16 no.3 July/Sept. 2006.

MORETAO, M. P., BUCHI, D. F., GORIN, P. A., IACOMINI, M., OLIVEIRA, M. B. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of Anadenanthera colubrina (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. Immunol Lett **89**(2-3): 175-185, 2003.

MORETAO, M. P., ZAMPRONIO, A. R., GORIN,P. A., IACOMINI, M., OLIVEIRA M. B. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of Anadenanthera colubrina (Angico branco). **Immunol Lett** 93(2-3): 189-197, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** 65(1-2): 55-63, 1983.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **J Leukoc Biol** 73(2): 209-212, 2003.

MOSSER, D. M., EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol** 8(12): 958-969, 2008.

NAIR, R., CHANDA, S.. Antimicrobial Activity of Terminalia catappa, Manilkara zapota and Piper betel Leaf Extract. **Indian J Pharm Sci** 70(3): 390-393, 2008.

NEWTON, K. DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 4(3), 2012.

NORRIS, P. C., DENNIS, E. A. A lipidomic perspective on inflammatory macrophage eicosanoid signaling. **Adv Biol Regul** 54: 99-110, 2014.

OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, A Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 423. 2001:27. Adopted 2001 Dec 17.

PAIVA, S.R., HERINGER, A.P., FIGUEREDO, M.R., KAPLAN, M.A.C. Taninos condensados de espécies de *Plumbaginaceae*. **Floresta e Ambiente** *9*: 153-157, 2002.

PEPINSKY, B., HESSION, C., CHEN, L., MOY, P., BURKLY, L., JAKUBOWSKI, A., CHOW, E. P., BENJAMIN, C., CHI-ROSSO,G., LUHOWSKYJ, S., LOBB, R. Structure/Function Studies on Vascular Cell Adhesion Molecule- 1. **The Journal Of Biological Chemistry**. Vol. 267, No. 25, September 5, pp. 17820-17826, 1992.

PERRETTI, M., CHIANG, N., LA, M., FIERRO, I. M., MARULLO, S., GETTING,S. J., SOLITO, E., SERHAN, C. N. Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. **Nat Med** 8(11): 1296-1302, 2002.

PESSOA, W. S., ESTEVAO, L. R., SIMOES, R. S., MENDONCA S., EVENCIO-LUZ, L., BARATELLA-EVENCIO, FLORENCIO-SILVA, L. R., SA, EVENCIO-NETO, F. B.J. Fibrogenesis and epithelial coating of skin wounds in rats treated with angico extract (Anadenanthera colubrina var. cebil). **Acta Cir Bras** 30(5): 353-358, 2015.

PETERS-GOLDEN, M., BROCK, T. G. Intracellular compartmentalization of leukotriene biosynthesis. **Am J Respir Crit Care Med** 161(2 Pt 2): S36-40, 2000.

PORCHERAY, F., VIAUD, S., RIMANIOL,A. C., LEONE, C., SAMAH, B., DEREUDDRE-BOSQUET, N., DORMONT, D., GRAS, G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. **Clin Exp Immunol** 142(3): 481-489, 2005.

RAMSTEDT, U., WIGZELL, H. C., SERHAN, N., SAMUELSSON, B. Action of novel eicosanoids lipoxin A and B on human natural killer cell cytotoxicity: effects on intracellular cAMP and target cell binding. **J Immunol** 135(5): 3434-3438, 1985.

REDDY, D. B., REDDY, T. C., JYOTSNA, G., SHARAN, S., PRIYA, N., LAKSHMIPATHI, V., REDDANNA, P. Chebulagic acid, a COX-LOX dual inhibitorisolated from the fruits of Terminalia chebula Retz., induces apoptosis in COLO-205 cell line. **J Ethnopharmacol** 124(3): 506-512, 2009.

RENIER, G., SKAMENE, E., DESANCTIS, J. B., RADZIOCH, D. Induction of tumor necrosis factor alpha gene expression by lipoprotein lipase. **J Lipid Res** 35(2): 271-278, 1994.

ROGERIO, A. P., FONTANARI, C., MELO, M. C., AMBROSIO, S. R., DE SOUZA, G. E., PEREIRA, P. S., FRANCA, S. C., DA COSTA, F. B., ALBUQUERQUE, D. A., FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of

Lafoensia pacari extract and ellagic acid. **J Pharm Pharmacol** 58(9): 1265-1273, 2006.

ROGERIO, A. P., FONTANARI, C., BORDUCCHI, E., KELLER, A. C., RUSSO, M., SOARES, E. G., ALBUQUERQUE, D. A., FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory effects of Lafoensia pacari and ellagic acid in a murine model of asthma. **Eur J Pharmacol.** 2;580(1-2):262-70. 2008.

SANTOS, J. S., MARINHO, R. R., EKUNDI-VALENTIM, E., RODRIGUES, L., YAMAMOTO, M. H., TEIXEIRA, S. A., MUSCARA, M. N., COSTA, S. K., THOMAZZI, S. M. Beneficial effects of Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **J Ethnopharmacol** 148(1): 218-222, 2013.

SERHAN, C. N., CHIANG, N. DALLI, J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. **Semin Immunol 27**(3): 200-215, 2015.

SHAILA, H. P., UDUPA, A. L., UDUPA, S. L. Preventive actions of Terminalia belerica in experimentally induced atherosclerosis. **Int J Cardiol** 49(2): 101-106, 1995.

SHEN, W., J. GAN, S. XU, G. JIANG, AND H. WU. Penehyclidine hydrochloride attenuates LPS-induced acute lung injury involvement of NF-kappaB pathway. **Pharmacological Research** 60: 296–302. 2009.

SICA, A., MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J Clin Invest** 122(3): 787-795, 2012.

SOUZA, M. H., DE LIMA, O. M., ZAMUNER JR., S. R., FIORUCCI, S., WALLACE, J. L. Gastritis increases resistance to aspirin-induced mucosal injury via COX-2-mediated lipoxin synthesis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 285(1): G54-61, 2003.

SPERTINI, O. (1996). [Regulation of leukocyte migration by adhesion molecules]. **Schweiz Med Wochenschr** 126(45): 1926-1934,1996.

STOUT, R. D., SUTTLES, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. **J Leukoc Biol**. 76(3):509-13.2004.

STROBER, S., HOLOSHITZ, J. Mechanisms of immune injury in rheumatoid arthritis: evidence for the involvement of T cells and heat-shock protein. **Immunol Rev**. 118:233-55.1990.

SUZUKI, Y. STUDY ON THE MECHANISM OF DEVELOPMENT OF SHOCK-LIKE SYMPTOMS. **Jibiinkoka**. 35:979-83.Dec; 1963.

TALWAR, S., NANDAKUMAR, K. P., NAYAK, G., BANSAL, P., MUDGAL, J., MOR, V., RAO, C. M., LOBO, R. Anti-inflammatory activity of Terminalia paniculata bark

extract against acute and chronic inflammation in rats. **J Ethnopharmacol** 134(2): 323-328, 2011.

VANE, J. The evolution of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their mechanisms of action. **Drugs** 33 Suppl 1: 18-27, 1987.

VANE, J., BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **FASEB J** 1(2): 89-96, 1987.

VANE, J. R., BOTTING, R. M. A better understanding of anti-inflammatory drugs based on isoforms of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2). **Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res** 23: 41-48,1995.

VANE, J. R., BOTTING, R. M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflamm Res** 47 Suppl 2: S78-87, 1998.

VANE, J. R., BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. **Thromb Res** 110(5-6): 255-258, 2003.

VERMA, N., TRIPATHI, S. K., SAHU, D., DAS, H. R., DAS, R. H. Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages. **Mol Cell Biochem**. 336(1-2):127-35. 2009.

VESTWEBER, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. **Nat Rev Immunol** 15(11): 692-704, 2015.

WILLIAMS, T.J. & PECK, M.J.. Role of prostaglandinmediated vasodilatation in inflammation. Nature, 270, 530-532. 1977.

WISSINK, S., VAN HEERDE, E. C., VAND DER BURG, B., VAN DER SAAG, P. T. A dual mechanism mediates repression of NF-kappaB activity by glucocorticoids. **Mol Endocrinol** 12(3): 355-363, 1998.

WU, L., ROSS, A. C. Inflammation induced by lipopolysaccharide does not prevent the vitamin A and retinoic acid-induced increase in retinyl ester formation in neonatal rat lungs. **Br J Nutr** 109(10): 1739-1745.

WU, Q., LIU, P., LI, DU, Y. M., XING, X., WANG, D. Inhibition of ROS elevation and damage to mitochondrial function prevents lead-induced neurotoxic effects on structures and functions of AFD neurons in Caenorhabditis elegans. **J Environ Sci (China)** 24(4): 733-742, 2012.

YAMAMOTO, M., TOCHINO, Y., CHIBANA, K., TRUDEAU, J. B., HOLGUIN, F., WENZEL, S. E. Nitric oxide and related enzymes in asthma: relation to severity, enzyme function and inflammation. **Clin Exp Allergy** 42(5): 760-768, 2012.

YEH, C. B., HSIEH, M. J., HSIEH, Y. S., CHIEN, M. H., LIN, P. Y., CHIOU, H. L., YANG, S. F. Terminalia catappa Exerts Antimetastatic Effects on Hepatocellular Carcinoma through Transcriptional Inhibition of Matrix Metalloproteinase-9 by

Modulating NF-kappaB and AP-1 Activity. **Evid Based Complement Alternat Med** 2012: 595292, 2012.

YI, X., CHENG,W., LIN, J., ZHOU, Q., WANG, C. Interaction between COX-1 and COX-2 Variants Associated with Aspirin Resistance in Chinese Stroke Patients. **J Stroke Cerebrovasc Dis** 25(9): 2136-2144, 2016.

YU, C. C., CHIEN, C. T., CHANG, T. C. M2 macrophage polarization modulates epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-induced tubulointerstitial fibrosis. **Biomedicine (Taipei)** 6(1): 5, 2016

ZHANG, Y. , LIN, J.X., VILCEK, J. Synthesis of interleukin 6 (interferon-beta 2/B cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. **J Biol Chem**. 6177-82, 263(13): 5, 1988.

ZHENG, Y., HUMPHRY, M. J., MAGUIRE, J., BENNETT, M. R., CLARKE, M. C. Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1alpha, controlling necrosis-induced sterile inflammation. **Immunity** 38(2): 285-295, 2013.

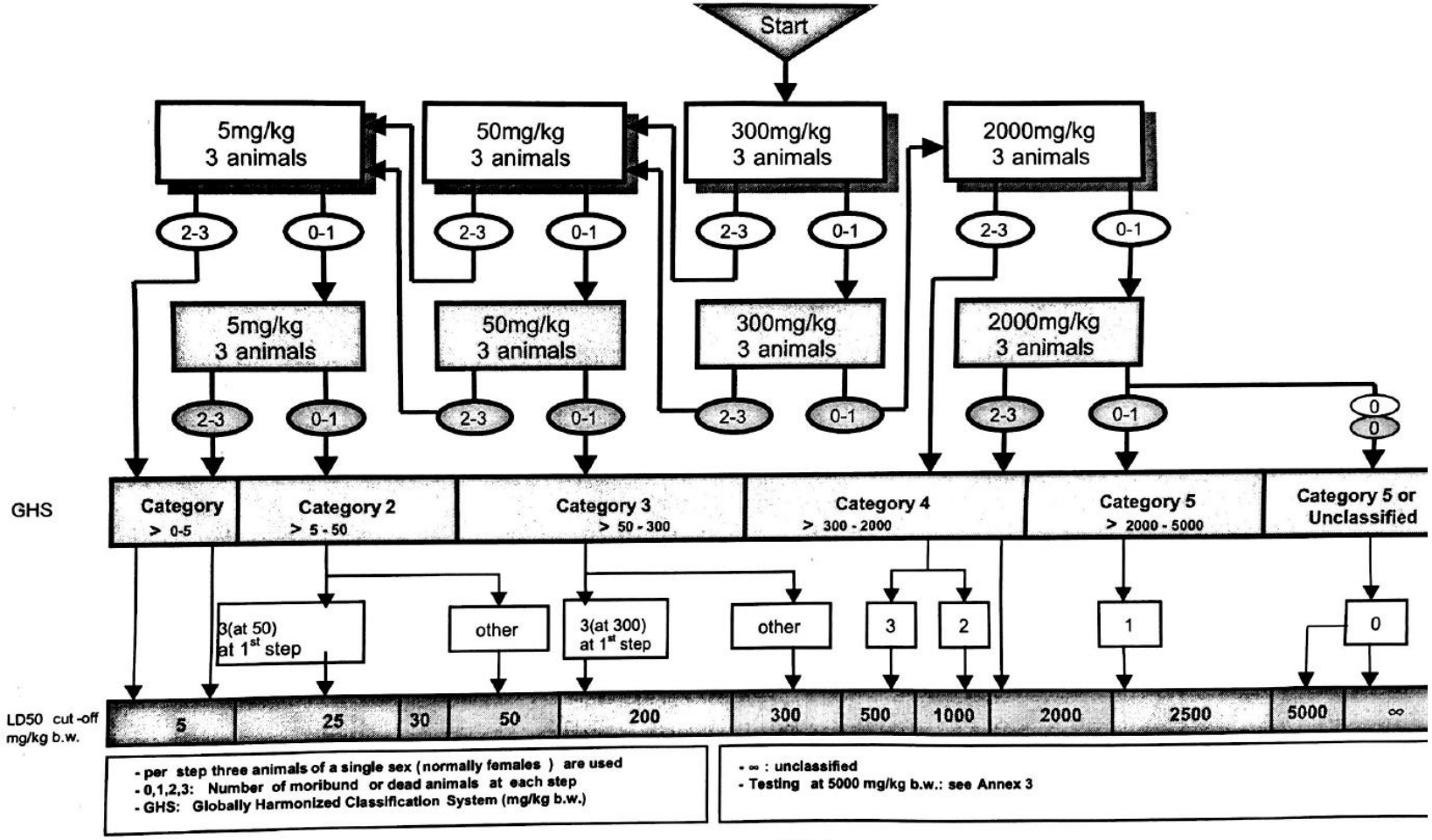
ZOCCAL, K. F., BITENCOURT, C. DA S., PAULA-SILVA, F. W., SORGI, C. A., BORDON, K. C. F., ARANTES, E. C., FACCIOLI, L. H. TLR2, TLR4 and CD14 recognize venom-associated molecular patterns from Tityus serrulatus to induce macrophage-derived inflammatory mediators. **PLoS One** 9(2): e88174, 2014.

ZOCCAL, K. F., SORGI, C. A., HORI, J. I., PAULA-SILVA, F. W., ARANTES, E. C., SEREZANI, C. H., ZAMBONI, D. S., FACCIOLI, L. H. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nat Commun** 7: 10760, 2016

ZUCALI, J.R., DINARELLO, C.A., OBLON, D.J., GROSS, M.A., ANDERSON, L., WEINER, R.S. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. **J Clin Invest**. 1857-63; 77(6): Jun, 1986.

9. ANEXOS

ANNEX 2c: TEST PROCEDURE WITH A STARTING DOSE OF 300 MG/KG BODY WEIGHT



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SCIENTIA VINCES