

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
DOUTORADO EM FARMÁCIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACO-MEDICAMENTOS**

RAFAEL DE LIZ

**ESTUDO DO EFEITO E DO MECANISMO DE AÇÃO ANTI-
INFLAMATÓRIA DA *Esenbeckia leiocarpa* Engl. UTILIZANDO
MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração Fármaco-Medicamentos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde

**FLORIANÓPOLIS
2012**

Liz, Rafael de

Estudo do efeito e do mecanismo de ação anti-inflamatória da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. utilizando modelos experimentais in vivo e in vitro [tese] / Rafael de Liz ; orientadora, Tânia Silvia Frøde - Florianópolis, SC, 2012. 161 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Esenbeckia leiocarpa* Engl.. 3. Inflamação. 4. Neutrófilos. I. Frøde, Tânia Silvia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Dedico esta tese aos meus pais Moacir e Nilva. Gostaria de agradecê-los de todo meu ser, pelo amor incondicional e pela confiança que sempre depositaram em mim. É, tanto nos momentos de conquistas, como nos de dificuldades, que refletimos e nos lembramos de que nada somos sozinhos. Lembramo-nos que, justamente quando vemos na areia apenas um par de pegadas, é que estamos sendo por Ele carregados.

Vocês, pai e mãe, sempre foram e sempre serão meus alicerces, meus exemplos, minha referência de tudo o que é certo, tudo o que é digno. Com estas poucas palavras, quero demonstrar-lhes minha profunda e eterna gratidão pela oportunidade e privilégio de estar junto de vocês nesta existência. Muito obrigado! Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, paz, proteção, maturidade, humildade e pela oportunidade de poder trabalhar com o que amo, sem deixar de lado meus princípios e a minha essência;

Aos meus pais, por me ensinarem o que é ser uma pessoa digna e correta, por terem apostado em mim desde sempre, por serem meu orgulho, meu norte, meu porto seguro e meu eterno exemplo;

À minha irmã, Fabiana por toda a compreensão, toda a ajuda e todo o apoio, por ouvir-me quando eu precisava desabafar, por escolher-me quando precisava de ouvidos;

À minha namorada, Laurien, por ser companheira, sincera, atenciosa, compreensível, amiga e namorada, e por tornar-me definitivamente um ser humano completo;

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Tânia Silvia Fröde, pela oportunidade de ter sido orientado, durante sete anos e meio, por uma pessoa tão competente, ética e correta, por sua confiança, amizade e por sua contribuição efetiva para minha formação acadêmica;

A meu avô Otacílio, a Sueli e a meus tios pelo carinho, apoio e confiança em mim depositada;

A Sueli (Suela) pela conversa, amizade e momentos de descontração;

Aos meus colegas de laboratório: Ziliani, Eduardo, Patrícia, Gustavo, Julia, Marina, Silvana, Bruno, Fábio, Rodrigo, Geison, Marcos, Janaína, Diana e Giliard pelo carinho, amizade, respeito, pela parceria nos inúmeros congressos e simpósios, e por sempre me fazerem sentir tão em casa, ainda que dentro do laboratório;

Ao Prof. Dr. Denis Girard por receber-me em seu laboratório, pelo respeito, pela orientação, pela amizade e pelo incentivo constante durante o estágio de doutorado sanduíche, no Canadá;

Aos meus amigos canadenses: David, Francis, Théo, Jean-Christophe, Marie-Michelle, Frank, Edilsys e Jennie, pela atenção, apoio, companheirismo e amizade essenciais durante meu estágio no exterior;

À Dr^ª Leila Zanatta e à Dr^ª Fátima Regina Mena Barreto Silva pelo auxílio com os experimentos do cálcio;

Aos professores Dr. Heros Horst e Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, pela análise fitoquímica;

Aos meus amigos: Jonathan, Diego, Juliano, Denis, Vinicius, André, Leandro e Rodrigo, pela amizade verdadeira e incondicional de toda uma vida;

Aos meus amigos Gabriel, Rodrigo, Charles e Jessé, pela amizade e parceria, que começou na faculdade e que continuará sempre;

À Universidade Federal de Santa Catarina, de que tanto me orgulho, onde fiz minha graduação, mestrado e doutorado em Farmácia, mas, acima de tudo, onde vivi intensamente nos últimos onze anos e meio;

Finalmente, a todos que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta tese.

LIZ, Rafael. **Estudo do efeito e do mecanismo de ação anti-inflamatória da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.** 2012. 161 p. Tese (Doutorado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Introdução: O gênero *Esenbeckia* (Rutaceae) compreende cerca de 30 espécies, sendo característico de regiões tropicais. A espécie *Esenbeckia leiocarpa* Engl. é conhecida popularmente no Brasil como guarantã, pau-duro, goiabeira ou guarataia. Espécies pertencentes ao gênero *Esenbeckia* têm sido utilizadas no tratamento de febre e/ou da malária por indivíduos da região amazônica. Estudos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram que espécies do gênero *Esenbeckia* possuem importantes ações farmacológicas, como atividade anticolinesterásica, antimalárica, anti-helmíntica e antimicrobiana. **Objetivos:** Estudar o efeito e o mecanismo de ação anti-inflamatória do extrato bruto hidroalcoólico (EBH), frações, subfrações e compostos isolados da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. **Materiais e Métodos:** O efeito do EBH, frações n-hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) ou alcaloide (Alc), subfrações polar (Pol) e apolar (Apol), ou dos compostos di-hidrocorinanteol (DHC) e beta-sitosterol (β -Sit) isolados do EBH foram investigados sobre migração de leucócitos, exsudação, mieloperoxidase (MPO), adenosina-desaminase (ADA), nitrato/nitrito (NO_x), interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$), fator de necrose tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e proteína inibitória kappa B-alfa ($\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$) na inflamação induzida pela carragenina (Cg) no modelo da bolsa de ar, em camundongos. Ainda, o mecanismo de ação anti-inflamatória exercido pelo EBH, fração Alc e composto DHC foram avaliados sobre a apoptose de neutrófilos humanos, bem como sobre a adesão celular e diferentes funções neutrofílicas, como: fagocitose, degranulação, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e citocinas/quimiocinas. Ainda, foi avaliado o efeito do β -Sit sobre a captação de cálcio (Ca^{2+}). **Resultados:** EBH, Alc, Pol, Apol, DHC e β -Sit, foram efetivos em inibir a migração de leucócitos, a exsudação e as concentrações de MPO, ADA, NO_x , $\text{IL-1}\beta$ e $\text{TNF-}\alpha$ ($P < 0,05$). As frações Hex e AcOEt inibiram todos os parâmetros inflamatórios estudados, exceto a

exsudação. O composto DHC inibiu a degradação da proteína inibitória I κ B- α . Ainda, EBH, Alc e DHC induziram a apoptose de neutrófilos humanos, quando comparados à apoptose espontânea (AE) (P < 0,05). EBH e Alc, mas não o DHC promoveram aumento significativo, tanto da fagocitose como do processo de adesão celular dos neutrófilos a células A549 (P < 0,05). EBH e Alc promoveram a degranulação, tanto de vesículas secretórias como de grânulos específicos/de gelatinase dos neutrófilos (P < 0,05). EBH, Alc e DHC promoveram também a degranulação de grânulos azurófilos de neutrófilos (P < 0,01). EBH, Alc e DHC inibiram significativamente a produção de EROs, assim como a produção de citocinas/quimiocinas, como interleucina-6 (IL-6), proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa (MIP-1 α), proteína inflamatória de macrófagos-1 beta (MIP-1 β) e oncogene-alfa relacionado ao crescimento (GRO- α) por neutrófilos ativados. β -Sit promoveu aumento significativo na captação de Ca²⁺ de forma tempo- e concentração-dependente em neutrófilos ativados, que foi prontamente inibido pela nifedipina, BAPTA-AM, LY294002 e colchicina (P < 0,05). **Conclusão:** Este estudo demonstrou que a *Esenbeckia leiocarpa* Engl. possui potente efeito anti-inflamatório. Este efeito parece estar relacionado à inibição da migração de leucócitos, essencialmente de neutrófilos ativados, uma vez que a planta promoveu a degranulação destas células, inibiu as concentrações de enzimas relacionadas à atividade neutrofílica (MPO e ADA), assim como a produção de EROs, aumentou a adesão e a fagocitose, além de induzir a apoptose de neutrófilos. Ainda, o material vegetal inibiu a exsudação, efeito este relacionado também à inibição das concentrações de NO e de citocinas/quimiocinas de caráter pró-inflamatório: IL-1 β , TNF- α , IL-6, MIP-1 α e MIP-1 β e GRO- α . O DHC parece ser um dos responsáveis pelo efeito observado, uma vez que também demonstrou efeito anti-inflamatório por meio da inibição da migração de leucócitos, enzimas e citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias, além de inibir a ativação do NF- κ B. Ainda, o β -Sit foi efetivo em inibir a resposta inflamatória de forma dependente da captação de Ca²⁺.

Palavras-chave: *Esenbeckia leiocarpa* Engl.; mecanismo de ação anti-inflamatória; modelo da bolsa de ar em camundongos; neutrófilos humanos.

LIZ, Rafael. **Study of the effect and mechanism of anti-inflammatory action of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. using *in vivo* and *in vitro* models.** 2012. 161 p. Thesis (Doctorate in Pharmacy) – Graduate Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: The genus *Esenbeckia* (Rutaceae) includes about 30 species, and is characteristic from tropical regions. *Esenbeckia leiocarpa* Engl. is popularly known in Brazil as “guarantã”, “pau-duro”, “goiabeira” or “guarataia”. *Esenbeckia* species have been used for treatment of fever and/or malaria by inhabitants of Brazilian amazon region. *In vitro* and *in vivo* studies have already demonstrated that *Esenbeckia* species have important pharmacological actions, such as anticholinesterasic, antimalaric, anthelmintic and antimicrobial activities. **Objectives:** The aim of this work was to evaluate the effect, as well as the mechanism of anti-inflammatory action of the crude hydroalcoholic extract (CHE), fractions, subfractions, and isolated compounds from *Esenbeckia leiocarpa* Engl. using *in vivo* and *in vitro* models. **Materials and Methods:** The effect of CHE, fractions n-hexane (Hex), ethyl acetate (AcOEt), and alkaloid (Alk), subfractions polar (Pol) and nonpolar (Nonpol), or isolated compounds dihydrocorynantheol (DHC) and beta-sitosterol (β -Sit) isolated from CHE upon leukocyte migration, exudation, myeloperoxidase (MPO) adenosine-deaminase (ADA), nitrate/nitrite (NO_x), interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$), tumour necrosis factor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$), and inhibitory kappa-B-alpha protein ($\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$) degradation in the inflammation induced by carrageenan (Cg) in the mouse air pouch model were investigated. Also, the mechanism of anti-inflammatory action of CHE, Alk and DHC on apoptosis of human neutrophil, as well as cell adhesion, and different neutrophil functions, such as: phagocytosis, degranulation, reactive oxygen species (ROS) and cytokines/chemokines production were evaluated. Also, the effect of β -Sit on the calcium (Ca^{2+}) uptake was evaluated. **Results:** The CHE, Alk, Pol, Nonpol, DHC and β -Sit, inhibited leukocytes, exudation, MPO, ADA, NO_x , $\text{IL-1}\beta$, and $\text{TNF-}\alpha$ ($P < 0.05$). The Hex and AcOEt fractions inhibited all of the proinflammatory parameters, except for the exudation. The compound DHC prevented the $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ degradation. Also, CHE, Alk, and DHC

accelerated the spontaneous apoptosis of human neutrophils ($P < 0.05$). CHE and Alk, but not DHC also increased both the phagocytosis and the adhesion exerted by neutrophils onto A549 cells ($P < 0.05$). CHE and Alk also promoted the degranulation of secretory vesicles and specific/gelatinase granules ($P < 0.05$). Also, CHE, Alk and DHC induced the degranulation of azurophilic granules ($P < 0.01$). Moreover, CHE, Alk and DHC significantly inhibited the ROS production, as well as the production of cytokines/chemokines, such as interleukin-6 (IL-6), macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 α), macrophage inflammatory protein-1 beta (MIP-1 β), and growth-related oncogene-alpha (GRO- α) by activated neutrophils. β -Sit promoted a time- and dose-dependent increase of the calcium uptake in activated neutrophils that was promptly reversed by nifedipine, BAPTA-AM, LY294002, and colchicine ($P < 0.05$).

Conclusion: This study showed that *Esenbeckia leiocarpa* Engl. has a potential anti-inflammatory effect. Such effect seems to be related to the inhibition of leukocyte migration, essentially activated neutrophils, since this herb promoted the degranulation on these cells, and inhibited the concentration of enzymes related to neutrophil activity (MPO and ADA), as well as the ROS production. It also increased both the phagocytosis and adhesion, besides inducing neutrophil apoptosis. *Esenbeckia leiocarpa* Engl. also inhibited the exudation, in a process related to the inhibition of NO concentrations, as well as concentrations of proinflammatory cytokines/chemokines: IL-1 β , TNF- α , IL-6, MIP-1 α e MIP-1 β e GRO- α . DHC seems to be one of the most responsible for this effect, since it also showed an anti-inflammatory effect by inhibiting leukocyte migration, enzymes and pro-inflammatory cytokines/chemokines, besides inhibiting NF- κ B activation. Also, β -Sit was effective in inhibiting the inflammatory response in a Ca²⁺ uptake-dependent manner.

Keywords: *Esenbeckia leiocarpa* Engl.; mechanism of anti-inflammatory action; mouse air pouch model; human neutrophils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Caules, folhas e inflorescências da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	26
Figura 2 -	Processo de migração leucocitária em camundongos	28
Figura 3 -	Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)	39
Figura 4 -	Mecanismo de ação dos glicocorticoides (GCs)	40
Figura 5 -	Estrutura química do composto 1: di-hidrocorinanteol (DHC) e do composto 2: beta-sitosterol (β -Sit) isolados da subfração apolar das cascas da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	56
Figura 6 -	Perfil cromatográfico (HPLC) do extrato bruto hidroalcoólico, fração alcaloide e subfração apolar isolados das cascas da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	57
Figura 7 -	Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (100-400 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos	60
Figura 8 -	Efeito da fração n-hexano (Hex) (5-50 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos	61
Figura 9 -	Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) (10-50 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos	62

- Figura 10 - Efeito da fração alcaloide (Alc) (5-50 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos 63
- Figura 11- Efeito da subfração polar (Pol) (2-10 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos 64
- Figura 12 - Efeito da subfração apolar (Apol) (1-5 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos 65
- Figura 13 - Efeito do composto 1: di-hidrocorinanteol (DHC) (0,5-2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos 66
- Figura 14 - Efeito do composto 2: beta-sitosterol (β -Sit) (0,5-2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos 67
- Figura 15 - Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre as concentrações da enzima mieloperoxidase (MPO) no modelo da bolsa de ar, em camundongos 68
- Figura 16 - Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre as concentrações da enzima adenosina-desaminase (ADA) no modelo da bolsa de ar, em camundongos 69
- Figura 17 - Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre as concentrações de nitrato/nitrito (NO_x) no modelo da bolsa de ar, em camundongos 70

Figura 18 - Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre a degradação da proteína inibitória kappa B-alfa (IκB-α) no modelo da bolsa de ar, em camundongos	72
Figura 19 - Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre as concentrações de interleucina-1 beta (IL-1β) no modelo da bolsa de ar, em camundongos	73
Figura 20 - Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre as concentrações de fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) no modelo da bolsa de ar, em camundongos	74
Figura 21 - Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre a apoptose de neutrófilos	87
Figura 22 - Envolvimento das caspases na apoptose induzida pela <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	88
Figura 23 - Envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROs) na apoptose induzida pela <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	90
Figura 24 - Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre a fagocitose exercida pelos neutrófilos	91
Figura 25 - Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre a adesão de neutrófilos a células da linhagem A549	92
Figura 26 - Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre a degranulação de neutrófilos	95
Figura 27 - Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre as concentrações intra e extracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos	97
Figura 28 - Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre	

- a produção de citocinas/quimiocinas por neutrófilos 98
- Figura 29 - Curva tempo-resposta da captação basal de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em neutrófilos murinos ativados 99
- Figura 30 - Envolvimento dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente do tipo L, das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , da enzima fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) e da rede de microtúbulos no efeito estimulatório do beta-sitosterol (β -Sit) na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em neutrófilos murinos ativados 101
- Figura 31 - Proposta de mecanismo de ação anti-inflamatória para a *Esenbeckia leiocarpa* Engl. 120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-LOX	5-lipoxigenase
12-HETE	Ácido 12-Hidroxi-5,8,10,14-Eicosatetraenoico
A549	Linhagem de células de carcinoma de pulmão humano
AcOEt	Fração acetato de etila isolada da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.
ADA	Adenosina-desaminase
AE	Apoptose espontânea
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
Alc	Fração alcaloide isolada da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.
AMP _C	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Fator ativador proteico-1
APAF-1	Fator ativador de proteases pró-apoptóticas-1
Apol	Subfração apolar isolada da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.
APP	Proteína precursora amiloide
β-Sit	Beta-sitosterol
β-tub	Beta-tubulina
BAPTA-AM	Quelante de cálcio intracelular
C5a	Fator do sistema complemento C5a
Ca ²⁺	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD15	Marcador de superfície de grânulos específicos/ de gelatinase
CD16	Receptor da fração Fcγ do tipo III
CD32	Receptor da fração Fcγ do tipo II
CD35	Marcador de superfície das vesículas secretórias
CD40L	CD40 ligante
CD63	Marcador de superfície de grânulos azurófilos
CD64	Receptor da fração Fcγ do tipo I
CD66	Marcador de superfície de grânulos específicos/ de gelatinase
CD66b	Marcador de superfície de grânulos específicos/ de gelatinase

CD67	Marcador de superfície de grânulos específicos/ de gelatinase
Cl ⁻	Ânion cloreto
Cg	Carragenina
CGD	Doença granulomatosa crônica
CHCl ₃	Clorofórmio
CH ₃ OH	Metanol
COX	Ciclooxigenase(s)
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CR	Receptores do complemento
CV	Coefficiente de variação
CXCL8	Interleucina-8 (IL-8)
Dexa	Dexametasona
DHC	Di-hidrocorinanteol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSS	Dextran sulfato de sódio
EBH	Extrato bruto hidroalcoólico da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.
EPM	Erro padrão da média
ERK1/2	Quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI-MS	Ionização eletrospray
FasL	Proteína Fas ligante
FcγR	Receptor para fração Fcγ
FcγRIV	Receptor para fração Fcγ do tipo IV
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fMLP	n-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GATA-3	Fator de transcrição ativador de células T <i>helper</i> 2
GC	Glicocorticoide
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
Gi/o	Proteína G inibitória
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
GR	Receptor de glicocorticoides
GRO-α	Oncogene-alfa relacionado ao crescimento
Gs	Proteína G estimulatória
GS1	Gás ionizador
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ DC-FDA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato

HBSS	Solução salina balanceada de Hanks
HCl	Ácido clorídrico
HClO	Ácido hipocloroso
Hex	Fração hexano isolada da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico
HL-60	Linhagem de células promielocíticas humanas
H ₁ N ₁	Vírus influenza A
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSP90	Proteína de choque térmico-90
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
ICAM-2	Molécula de adesão intercelular-2
IDV	Valores integrados de densidade
IFN- α	Interferon-alfa
IFN- γ	Interferon-gama
I κ B	Proteína inibitória kappa B
I κ B- α	Proteína inibitória kappa B-alfa
I κ B- β	Proteína inibitória kappa B-beta
I κ B- ϵ	Proteína inibitória kappa B-épsilon
IKK	I kappa B quinase
IL-1 α	Interleucina-1 alfa
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-1ra	Antagonista solúvel do receptor de interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-16	Interleucina-16
IL-17	Interleucina-17
IL-17E	Interleucina-17E
IL-23	Interleucina-23
IL-27	Interleucina-27
IL-32 α	Interleucina-32 alfa
Indo	Indometacina
IP-10/CXCL10	Proteína-10 induzida por IFN- γ
I-TAC/CXCL11	Quimiotático-alfa de células T induzível por Interferon

J774A,1	Linhagem de macrófagos de camundongo
JAM	Molécula de adesão juncional
JNK	Jun N-terminal quinase
Krb	Tampão Krebs Ringer-bicarbonato
LAD	Deficiência de adesão leucocitária
LDH	Lactato desidrogenase
LFA-1/CD11a/CD18	Antígeno associado à função de linfócito-1
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA ₄	Leucotrieno A ₄
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
LTE ₄	Leucotrieno E ₄
LY294002	Inibidor da enzima fosfatidilinositol-3 quinase
MAC-1	Antígeno de macrófagos-1
MADCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular de mucosa-1
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1/CCL2	Proteína quimiotática de monócitos-1
MFI	Intensidade de fluorescência média
MIF	Fator inibitório de macrófagos
MIP-1 α /CCL3	Proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa
MIP-1 β /CCL4	Proteína inflamatória de macrófagos-1 beta
MMP9	Metaloproteinase-9 da matriz
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	Fosfato de sódio monobásico dodeca-hidratado
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Fosfato dibásico de sódio mono-hidratado
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-AT	Fator de transcrição de células T ativadas
NF- κ B	Fator de transcrição kappa B
NH ₃	Amônia
NH ₃ SO ₄	Sulfato de amônia
NK	Células <i>natural killer</i>
NLRs	Receptores do tipo <i>nod</i>
NO	Óxido nítrico
NO ₃ ⁻	Nitrato
NO ₂ ⁻	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS/NOS3	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS/NOS2	Óxido nítrico sintase induzida

nNOS/NOS1	Óxido nítrico sintase neuronal
NO _x	Nitrato/nitrito
O ₂ ⁻	Radical ânion superóxido
·OH	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Ânion peroxinitrito
OVA	Ovalbulmina
p38	p38 MAPK
P388D1	Linhagem de macrófagos murinos
p40 ^{phox}	Componente citosólico da enzima NADPH oxidase
p47 ^{phox}	Componente citosólico da enzima NADPH oxidase
p67 ^{phox}	Componente citosólico da enzima NADPH oxidase
PAF	Fator ativador plaquetário
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio-1
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PECAM-1	Molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta-1
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F ₂ alfa
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂ (prostaciclina)
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase
PKA	Proteína quinase A
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PMA	Forbol-12-mirostato-13-acetato
Pol	Subfração polar isolada da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.
PS1	Presenilina
PSGL-1	Glicoproteína ligante da P-selectina-1
RMN	Ressonância magnética nuclear
RANTES/CCL5	<i>Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted</i>
RAW264.7	Linhagem de macrófagos de camundongo
RelA (p65)	Subunidade p65 do NF-κB
RelB	Subunidade do NF-κB
c-Rel	Subunidade do NF-κB
SB203580	Inibidor da p38 MAPK
SDF-1	Fator derivado de célula estromal-1
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de eletroforese com paracrilamida-dodecil-sulfato de sódio
SHP-1	Tirosina fosfatase

SOD	Superóxido dismutase
STATs	Transdutores de sinal ativadores de transcrição
TBS-Tween	Tampão Tris-HCl/Tween-20
TCR	Receptor de célula T
T _H 1	Linfócito T <i>helper</i> 1
T _H 17	Linfócito T <i>helper</i> 17
T _H 2	Linfócito T <i>helper</i> 2
TLRs	Receptores do tipo <i>toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TNFR2	Receptor 2 do fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito T regulador
TREM-1	Receptor de desencadeamento expresso em células mielóides-1
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TXB ₂	Tromboxano B ₂
VCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular-1
VCl ₃	Cloreto de vanádio
VLA-4	<i>Very late antigen</i> -4 (α 4 β 1 integrina)
z-DQMD-FMK	z-Asp(OMe)-Gln-Met-Asp(OMe)-FMK (inibidor da caspase-3)
z-LEHD-FMK	z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-FMK (inibidor da caspase-9)
z-VAD-FMK	N-ben-ziloxicarbonil-V-A-D-O-metilfluorometilcetona (inibidor das caspases 1, 3, 4 e 7)
z-VEID-FMK	z-Val-Glu(OMe)-Ile-Asp(OMe)-FMK (inibidor da caspase-6)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	PLANTAS MEDICINAIS	25
1.2.	PROCESSO INFLAMATÓRIO	27
2	OBJETIVOS	42
2.1.	OBJETIVO GERAL	42
3.	ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	43
3.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.2.1.	Coleta do material vegetal	44
3.2.2.	Obtenção do extrato, frações, subfrações e compostos isolados	44
3.2.3.	Isolamento dos compostos da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	45
3.2.4.	Elucidação estrutural dos compostos isolados da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	46
3.2.5.	Animais	47
3.2.6.	Protocolo experimental	47
3.2.7.	Contagem total e diferencial de leucócitos	48
3.2.8.	Coloração dos esfregaços celulares	48
3.2.9.	Determinação da exsudação	49
3.2.10.	Determinação das concentrações da mieloperoxidase	49
3.2.11.	Determinação das concentrações da adenosina-desaminase	50
3.2.12.	Determinação das concentrações de nitrato/nitrito	50

3.2.13. Determinação da degradação da proteína inibitória kappa B-alfa	51
3.2.14. Determinação das concentrações de interleucina-1 beta e fator de necrose tumoral-alfa	52
3.2.15. Fármacos e reagentes	53
3.2.16. Análise estatística	54
3.3. RESULTADOS	55
3.3.1. Análise fitoquímica	55
3.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	55
3.3.3. Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre a migração de leucócitos e a exsudação	58
3.3.4. Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre as concentrações da MPO	68
3.3.5. Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre as concentrações da ADA	69
3.3.6. Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre as concentrações de NO _x	70
3.3.7. Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre a Degradação de IκB-α	71
3.3.8. Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre as concentrações de IL-1β	72
3.3.9. Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre as concentrações de TNF-α	73
4. ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	75
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	75

4.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	76
4.2.1.	Material vegetal	76
4.2.2.	Isolamento de neutrófilos humanos	76
4.2.3.	Avaliação da citotoxicidade	76
4.2.4.	Determinação da apoptose celular	77
4.2.5.	Determinação da fagocitose por neutrófilos	78
4.2.6.	Determinação da adesão de neutrófilos	78
4.2.7.	Avaliação da degranulação de neutrófilos	79
4.2.8.	Determinação das concentrações intracelulares e extracelulares de espécies reativas de oxigênio	80
4.2.9.	Produção de citocinas/quimiocinas por neutrófilos	81
4.2.10.	Efeito do beta-sitosterol sobre a captação de cálcio por neutrófilos ativados	82
4.2.11.	Fármacos e reagentes	83
4.2.12.	Análise estatística	84
4.3.	RESULTADOS	85
4.3.1.	Avaliação da citotoxicidade da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	85
4.3.2.	Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre a apoptose celular	85
4.3.3.	Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre a fagocitose de neutrófilos	91
4.3.4.	Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre a adesão de neutrófilos	92
4.3.5.	Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	

	sobre a degranulação de neutrófilos	93
4.3.6.	Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre a produção de EROs por neutrófilos	94
4.3.7.	Efeito da <i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl. sobre a produção de citocinas/quimiocinas por neutrófilos	96
4.3.8.	Efeito do beta-sitosterol sobre a captação de cálcio por neutrófilos ativados	99
5	DISCUSSÃO	102
6	CONCLUSÃO	119
7	REFERÊNCIAS	129
	ANEXOS	149
	ANEXO 1: Protocolo de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) (PP00294/2009)	149
	ANEXO 2: Resumos apresentados em anais de congressos	151
	ANEXO 3: Artigo 1 publicado	154
	ANEXO 4: Artigo 2 publicado	156
	ANEXO 5: Artigo 3 publicado	158
	ANEXO 6: Artigo 4 aceito para publicação	160

1. INTRODUÇÃO

1.1. PLANTAS MEDICINAIS

Nos últimos anos, pesquisas relacionadas às propriedades químicas e farmacológicas de plantas medicinais estão voltadas à procura de substâncias com atividade biológica, no sentido de prover uma base científica à utilização popular (GIORGETTI; NEGRIS; RODRIGUES, 2007; SILVA et al., 2011; KAROU et al., 2011), ou para a obtenção de novas estruturas químicas de interesse para a indústria farmacêutica, com propriedades farmacológicas específicas, podendo resultar em novos fármacos e/ou medicamentos fitoterápicos.

Muitas plantas já foram identificadas com potencial atividade anti-inflamatória, como por exemplo, a *Salvia officinalis* (RODRIGUES et al., 2012), a *Passiflora edulis* (MONTANHER et al., 2007), a *Solidago chilensis* Meyen (GOULART et al., 2007; LIZ et al., 2008) e a *Rosmarinus officinalis* L. (NOGUEIRA DE MELO et al., 2011), e algumas delas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias, principalmente aquelas de caráter crônico, como a artrite reumatoide, o diabetes e a asma brônquica (KAPLAN et al., 2007; SINGH; SINGH; GOEL, 2011).

A espécie *Esenbeckia leiocarpa* Engl., conhecida popularmente no Brasil como guarantã, pau-duro, goiabeira ou guarataia, pertence ao gênero *Esenbeckia* e à família Rutaceae (Figura 1). O gênero *Esenbeckia* (Rutaceae) compreende cerca de 30 espécies, sendo característico de regiões tropicais (KAASTRA, 1977). As espécies pertencentes a este gênero têm sido utilizadas no tratamento da febre causada pela malária por indivíduos da região amazônica (DOLABELA et al., 2008).



Figura 1: Caules, folhas e inflorescências da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Fonte: <http://www.fazendacitra.com.br/dierberger/images/zoom/arvores/thumbs/esenbeckia-leiocarpa.jpg>; acesso em: 05/06/2008.

Estudos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram que espécies do gênero *Esenbeckia* possuem importantes efeitos farmacológicos. Dentre elas, podem-se destacar: atividade anticolinesterásica (CARDOSO-LOPES et al., 2010), atividade antimalárica (CARVALHO et al., 1991; DOLABELA et al., 2008), anti-helmíntica (NAPOLITANO et al., 2004) e antimicrobiana (AGUILAR-GUADARRAMA; RIOS, 2004).

De maneira interessante, estudos fitoquímicos evidenciaram a presença de diferentes constituintes químicos para este gênero. Por exemplo, Nunes e colaboradores (2005) indicaram a presença de alcaloides (limonoides, acridonas e furoquinolinas) para *Esenbeckia* sp. Mais especificamente, para a espécie *Esenbeckia leiocarpa* Engl., Delle Monache e colaboradores (1989) demonstraram a existência de alcaloides indólicos, triterpenos e lignanas em suas raízes. Da mesma forma, Nakatsu e colaboradores (1990) isolaram diferentes alcaloides desta espécie.

Estas classes fitoquímicas poderiam direcionar os estudos desta pesquisa, uma vez que a literatura já publicada para o gênero *Esenbeckia* referencia estes compostos como sendo os constituintes majoritários. Além disso, estudos demonstraram que diferentes alcaloides promoveram importante efeito anti-inflamatório, o que pode ser verificado nos trabalhos referenciados a seguir.

Xiong e colaboradores (2007) demonstraram que o alcaloide ligustrazina inibiu a expressão do fator de transcrição ativador de células T helper 2 (GATA-3), bem como a síntese de interleucina-4

(IL-4), levando conseqüentemente à inibição da migração de eosinófilos para o tecido pulmonar, no modelo de asma induzido por ovalbumina (OVA), em ratos, desempenhando, desta forma, importante efeito anti-inflamatório. Ainda, estudos *in vitro* evidenciaram que frações alcaloídicas foram efetivas em inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interferon-alfa (IFN- α), em monócitos humanos infectados pelo vírus da dengue, caracterizando novamente uma atividade anti-inflamatória (REIS et al., 2008).

Entretanto, até o presente momento, poucos estudos foram realizados objetivando avaliar o efeito anti-inflamatório da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Neste sentido, Pozzatti e colaboradores (2011) demonstraram que a planta em questão foi efetiva em inibir a inflamação induzida pela carragenina, no modelo da pleurisia, em camundongos. Contudo, o mecanismo de ação anti-inflamatória exercido por esta planta permanece desconhecido. Desta forma, é importante estudar o efeito, bem como o mecanismo de ação anti-inflamatória exercido pela *Esenbeckia leiocarpa* Engl., em modelos experimentais de inflamação tanto *in vivo* como *in vitro*, uma vez que estudos fitoquímicos indicaram a presença de compostos com potencial atividade biológica para esta espécie.

1.2. PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório é uma resposta de defesa do organismo na tentativa de eliminar um eventual agente lesivo e, conseqüentemente, promover o reparo tecidual (MEDZHITOV, 2008). Esta resposta envolve uma série de eventos celulares, podendo-se destacar a ativação de diferentes enzimas, além da liberação de mediadores pró-inflamatórios, como NO e diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (KUBES, 1993; VAN DER VEEN; DE WINTHER; HEERINGA, 2009; KOBAYASHI, 2010; BARLETTA; LEY; MEHAD, 2012).

As citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias são liberadas por células sentinelas residentes, como, por exemplo, células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou células parenquimais (KUBES, 1993; PHILLIPSON; KUBES, 2011). Estes mediadores formam um gradiente de concentração, promovendo a quimiotaxia de células para o local da inflamação, primeiramente neutrófilos e

posteriormente monócitos pelo endotélio de vênulas pós-capilares e (MEDZHITOV, 2008; MEDZHITOV; HORNG, 2009; KOH; DIPIETRO, 2011) (Figura 2).

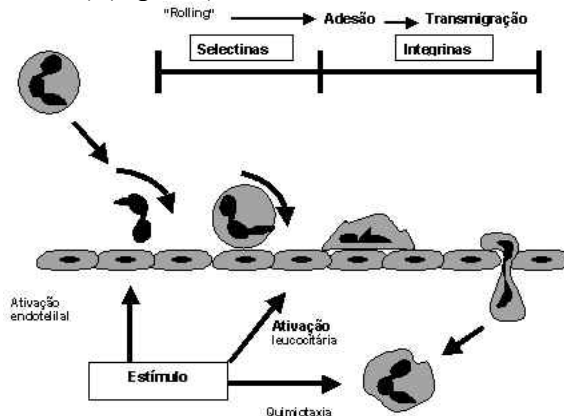


Figura 2: Processo de migração leucocitária. Inicialmente ocorre a marginalização e consequente rolamento dos neutrófilos sobre a parede do endotélio vascular. Estas células então aderem firmemente ao endotélio e, finalmente transmigram para o tecido-alvo. Fonte: <http://www.crono.icb.usp.br/glandpineal.htm>; acesso em: 15/03/2012.

Durante este processo, neutrófilos e posteriormente monócitos circulantes expressam moléculas de adesão, do tipo selectinas, como a L-selectina, possibilitando a interação com ligantes presentes nas células endoteliais, como E- e P-selectinas, além da glicoproteína ligante da P-selectina-1 (PSGL-1), promovendo a marginalização e o consequente rolamento dos leucócitos pelo endotélio vascular. Este processo promove alterações conformacionais de moléculas de adesão do tipo integrinas, como a $\alpha_4\beta_1$ integrina (*very late antigen-4*; VLA-4), o antígeno associado à função de linfócitos-1 (LFA-1; CD11a/CD18) e o antígeno de macrófagos-1 (MAC-1; CD11b/CD18). Estas moléculas expressas nos leucócitos circulantes interagem com moléculas de adesão expressas nas células endoteliais, como moléculas de adesão intercelular-1 e -2 (ICAM-1 e -2), molécula de adesão de célula vascular-1 (VCAM-1) e molécula de adesão de célula vascular de mucosa-1 (MADCAM-1), levando à firme aderência dos leucócitos ao endotélio vascular. Finalmente, o processo de transmigração celular é diretamente mediado pela expressão de moléculas de adesão do tipo ICAM-2, molécula de adesão de célula

endotelial e plaqueta-1 (PECAM-1), além de proteínas da família das moléculas de adesão juncionais (JAM) (ZARBOCK; LEY, 2009; WRIGHT et al., 2010).

A deficiência de moléculas de adesão leva a deficiência no recrutamento de leucócitos para o tecido lesado, como ocorre em pacientes com deficiência de adesão leucocitária (LAD), que apresentam infecções bacterianas recorrentes e, conseqüentemente, apresentam baixa expectativa de vida (ZARBOCK; LEY, 2009). Ainda, a grande maioria das selectinas, além de integrinas e superfamília das imunoglobulinas já foram descritas no tecido sinovial de pacientes com artrite reumatoide (AGARWAL; BRENNER, 2006; SZEKANECZ; KOCH, 2008).

Com relação às principais células que participam da resposta inflamatória, pode-se destacar o sistema fagocítico mononuclear. Este sistema compreende os monócitos, que são leucócitos circulantes que, por sua vez, podem ser atraídos para o tecido lesado e, conseqüentemente diferenciados em células fagocíticas, como os macrófagos. Estas células desempenham diferentes funções, tanto na resposta imune inata, como adaptativa, em diferentes processos mediados pela expressão de grande variedade de receptores, incluindo receptores do tipo *toll* (TLRs), do tipo *nod* (NLRs) e de lectina do tipo C, além de modularem a formação do inflamassoma (MOSSER; EDWARDS, 2008). Desta forma, os macrófagos levam à destruição de partículas estranhas e bactérias pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 beta (IL-1 β) e TNF- α , além de apresentarem atividade catabólica e proteolítica, e promoverem a fagocitose de restos celulares e o reparo tecidual (POLLARD, 2009; GALLI et al., 2011).

Com relação aos mediadores sintetizados, liberados ou que tenham receptores expressos por células mononucleares durante o processo inflamatório, pode-se destacar a adenosina. Este nucleosídeo é liberado no meio extracelular e exerce uma ação pleiotrópica, podendo desempenhar um efeito pró- ou anti-inflamatório, dependendo de sua concentração, bem como dos receptores envolvidos. Quatro receptores acoplados à proteína G já foram identificados para a adenosina, e são denominados receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (LINDEN, 2011). A ligação deste nucleosídeo a estes receptores promove diversos efeitos biológicos e algumas vezes opostos (LINDEN, 2011; BARLETTA; LEY; MEHRAD, 2012). Os

receptores A_1 e A_3 são acoplados à proteína G inibitória (Gi/o) e apresentam alta afinidade pela adenosina. Já os receptores A_{2A} e A_{2B} , que são acoplados à proteína G estimulatória (Gs), apresentam baixa afinidade por este nucleosídeo, e promovem aumento nas concentrações citosólicas de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O efeito anti-inflamatório predominante da adenosina parece ser mediado por sua ligação ao receptor A_{2A} (LINDEN, 2011; BARLETTA; LEY; MEHRAD, 2012).

Durante a resposta inflamatória, ocorre a formação de grandes quantidades de adenosina extracelular, que é degradada por meio da reação de desaminação catalisada pela enzima adenosina-desaminase (ADA) (NOVAKOVA; DOLEZAL, 2011).

Além disso, estudos clínicos demonstraram que pacientes que não são capazes de expressar ADA normalmente apresentam imunodeficiência severa, decorrente de defeitos no desenvolvimento de linfócitos T, B e células *natural killer* (NK) (BOOTH et al., 2012). Ainda, a quantificação da atividade desta enzima no soro tem sido utilizada como marcador preditivo de atividade de doença em pacientes com artrite reumatoide (ZAMANI; JAMALI; JAMALI, 2012).

Outro grupo de células que desempenha um papel fundamental na imunidade inata e no estabelecimento do processo inflamatório são os neutrófilos. Estes são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico humano, representando 40 a 60% dos leucócitos circulantes e constituindo a primeira linha de defesa contra patógenos, como bactérias, fungos, entre outros (LUO; LOISON, 2008; KUMAR; SHARMA, 2010). Estas células são as primeiras a migrar para o local da inflamação, em um processo mediado diretamente por diferentes moléculas de adesão (WRIGHT et al., 2010; WILLIAMS et al., 2011; SADIK; KIM; LUSTER, 2011).

Os neutrófilos são células efetas, que não se diferenciam e normalmente apresentam meia-vida relativamente curta, de 8 a 20 h na circulação e de 1 a 4 dias no tecido. Nos humanos, a quantidade diária de neutrófilos eliminados da circulação é de aproximadamente $0,8-1,6 \times 10^9$ células por quilograma de massa corpórea para a manutenção da homeostasia em condições fisiológicas (LUO; LOISON, 2008).

O processo de ativação dos neutrófilos é mediado por segundos mensageiros intracelulares. Dentre estes, pode-se destacar o cálcio (Ca^{2+}). Este cátion é essencial tanto para o processo de ativação,

como para funções efetoras dos neutrófilos na resposta inflamatória, como a produção de radical ânion superóxido (O_2^-), a adesão ao endotélio vascular, a degranulação, a ativação da enzima fosfolipase A_2 (PLA_2) e da 5-LOX citosólicas, assim como a síntese de interleucina-8 (IL-8) (TINTINGER et al., 2009a; 2009b). Este processo de ativação ocorre pela interação das células neutrofilicas com moléculas quimioatrativas, como n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), fator do sistema complemento C5a (C5a), leucotrieno B_4 (LTB_4), fator ativador plaquetário (PAF) ou IL-8 (TINTINGER et al., 2009a).

Uma vez ativados, os neutrófilos migram para o local da inflamação, onde liberam uma grande quantidade de EROs, enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos, que são armazenados basicamente em quatro tipos de grânulos (SIMARD; GIRARD; TESSIER, 2009). As vesículas secretórias são formadas por endocitose e contêm a maior concentração de proteínas plasmáticas e receptores de membrana, sendo essenciais para a resposta inflamatória mediada pelos neutrófilos (SOEHNLEIN; ZERNECKE; WEBER, 2009). Os grânulos de gelatinase ou terciários são facilmente liberados e constituem uma fonte de metaloproteinases. Ainda, Os grânulos específicos ou secundários são ricos em lisozimas, lactoferrinas e colagenases e, conseqüentemente, desempenham um papel fundamental na atividade microbicida dos neutrófilos (WRIGHT et al., 2010). Finalmente, os grânulos azurófilos ou primários possuem grande quantidade de enzimas lisossomais, como a elastase, a catepsina G, a proteinase-3 e a enzima mieloperoxidase (MPO) (CHAM; GERRARD; BAINTON, 1994; SOEHNLEIN; ZERNECKE; WEBER, 2009).

A MPO é sintetizada principalmente por neutrófilos, e pertence à superfamília das hemeoproteínas. Esta é uma proteína catiônica que se liga a moléculas aniônicas presentes na parede celular bacteriana, componentes da matriz extracelular e membranas celulares, incluindo as células endoteliais e os próprios neutrófilos. Esta enzima está relacionada à defesa do hospedeiro. No entanto, em algumas situações pode contribuir para o processo de lesão tecidual (VAN DER VEEN; DE WINTHER; HEERINGA, 2009).

A MPO catalisa a formação do ácido hipocloroso ($HClO$), um dos grandes responsáveis pelo efeito microbicida dos neutrófilos (MALLE et al., 2007; VAN DER VEEN; DE WINTHER;

HEERINGA, 2009; MONTESEIRÍN, 2009). Esta reação ocorre a partir da liberação de íons cloreto (Cl⁻) e de H₂O₂ presentes nos fagossomas. O H₂O₂, por sua vez, é principalmente proveniente do processo de metabolismo oxidativo também denominado *burst* respiratório, por meio de uma reação catalisada pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (MALLE et al., 2007).

Ainda, a MPO está associada a efeitos fisiopatológicos tanto em fagócitos, como em células endoteliais, contribuindo para o processo inflamatório em pacientes com aterosclerose (CHEN et al., 2011a). Da mesma forma, diversos estudos já demonstraram o papel desta enzima em diferentes doenças de caráter inflamatório, como doença de Parkinson, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, entre outras (CHOI et al., 2005; VAN DER VEEN; DE WINTHER; HEERINGA, 2009).

Durante a resposta inflamatória, o controle da morte dos granulócitos e a eliminação dos corpos apoptóticos ocorrem, principalmente pela fagocitose destas células por macrófagos residentes. Este processo é fundamental não só para a homeostasia tecidual, mas também para a resolução da inflamação e o reparo tecidual (FOX et al., 2010; KOH; DIPIETRO, 2011). Em condições fisiológicas, a apoptose dos neutrófilos ocorre por um processo conhecido como apoptose espontânea ou constitutiva (LUO; LOISON, 2008; BORREGAARD, 2010; GEERING; SIMON, 2011). Já no local da inflamação, os neutrófilos podem entrar em apoptose espontaneamente, bem como terem a apoptose induzida pela ativação de receptores de morte, por ligantes, como o TNF- α e a proteína Fas ligante (FasL) (FOX et al., 2010; GEERING; SIMON, 2011).

Durante o processo de apoptose, ocorrem diferentes alterações bioquímicas nos neutrófilos, como a ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, a perda do potencial transmembranar mitocondrial e a exposição de resíduos de fosfatidilserina na superfície e a ativação de diferentes caspases (GEERING; SIMON, 2011; BRATTON; HENSON, 2011).

As caspases são enzimas proteolíticas envolvidas principalmente na indução e na execução das diferentes fases da apoptose e na inflamação, bem como no processo de sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (LAMKANFI et al., 2007; HÄCKER; SISAY; GÜTSCHOW, 2011). Estas desempenham seu

papel na apoptose basicamente por duas vias: a via extrínseca, desencadeada pela ativação de um grupo de receptores de membrana pertencentes à superfamília dos receptores de TNF, e a via intrínseca, ativada por estresse intra ou extracelular, desencadeado pela ausência/carência de fatores de crescimento específicos, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Nos neutrófilos, a apoptose é diretamente mediada pela ativação de diferentes caspases efetoras tanto pela via intrínseca como pela via extrínseca. De fato, diversos estudos demonstraram que estas células expressam grande variedade destas proteases, incluindo caspase 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 e 14 (YAMASHITA et al., 1999; MOULDING et al., 2001; MURPHY et al., 2003; MAIANSKI et al., 2004).

Outra importante função exercida por células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, durante a resposta inflamatória é a fagocitose. Este processo é caracterizado pela internalização de um organismo ou partícula-alvo, pela emissão de pseudópodos, caracterizada por um rearranjo no citoesqueleto celular, levando a formação de fagossomas. Nos neutrófilos, a formação destes fagossomas é facilitada pela presença dos diferentes grupos de grânulos, que podem rapidamente fundir-se com o fagossoma formado, liberando grande quantidade de enzimas proteolíticas, EROs e peptídeos antimicrobianos (NORDENFELT; TAPPER, 2011).

Durante a fagocitose, há a ativação de receptores nas células fagocíticas, dentre os quais destacam-se os receptores Fc γ (Fc γ R) que reconhecem imunoglobulinas do tipo IgG. Nestas células, há a expressão constitutiva dos receptores FC γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32), Fc γ RIIIb (CD16) e Fc γ RIV, que são responsáveis pelo reconhecimento, fagocitose e morte intracelular de patógenos opsonizados (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007; THEPEN et al., 2009). Além disso, algumas células fagocíticas, como os neutrófilos expressam receptores que podem reconhecer diretamente o patógeno, como os TLRs (HAYASHI; MEANS; LUSTER, 2003), os NLRs (EKMAN; CARDELL, 2010) e a dectina-I (KENNEDY et al., 2007).

Estudos já demonstraram que a fagocitose desempenha papel central em inúmeras doenças neurodegenerativas de caráter inflamatório, como a doença de Alzheimer e a de Parkinson (NEHER; NENISKYTE; BROWN, 2012). Ainda, Paino e colaboradores (2011)

demonstraram que a fagocitose exercida por neutrófilos é essencial na patogênese de doenças reumáticas, como por exemplo, a artrite reumatoide.

Dentre as substâncias liberadas pelos neutrófilos, na tentativa de eliminar um agente lesivo, podem-se destacar o NO e as EROs.

ONO é um gás solúvel, relacionado a várias funções fisiológicas, incluindo transmissão neuronal, relaxamento vascular, imunomodulação e citotoxicidade (TSUCHIYA et al., 2007). Este mediador é sintetizado principalmente por células endoteliais, macrófagos e neutrófilos, a partir da reação de conversão da L-arginina em L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (FORTIN et al., 2010). Até o presente momento, três isoformas desta enzima são conhecidas: duas constitutivas, dependentes da concentração de Ca^{2+} : NOS neuronal (nNOS/NOS1) e NOS endotelial (eNOS/NOS3), além da iNOS/NOS2, independente da concentração de Ca^{2+} e expressa a partir de um estímulo como a inflamação (MARIOTTO et al., 2007; KOBAYASHI, 2010; FORTIN et al., 2010).

Durante a resposta inflamatória, a iNOS catalisa a formação de grandes quantidades de NO levando, conseqüentemente à formação de outras espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o ânion peroxinitrito (ONOO⁻). Esta espécie reativa é formada a partir da combinação do NO com o O_2^- proveniente do *burst* respiratório, em uma reação catalisada pela enzima NADPH oxidase. O ONOO⁻ formado, por sua vez, é responsável pela nitrosilação de proteínas e promove a oxidação de diferentes moléculas biológicas, como aminoácidos e ácidos nucleicos, levando ao dano tecidual e ao processo inflamatório (FORTIN et al., 2010). Além disso, as espécies reativas formadas induzem a ativação do NF- κ B, levando a um aumento na expressão de vários mediadores pró-inflamatórios, como moléculas de adesão, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e iNOS (KELLEHER et al., 2007; MANTOVANI, 2010).

O NO já foi descrito na patogênese de diferentes doenças inflamatórias, como por exemplo, sepse, lúpus eritematoso sistêmico e asma (FORTIN et al., 2010; LEE et al., 2012; AYTEKIN, M; DWEIK, 2012). Além disso, estudos demonstraram a participação de NO em doenças reumáticas, como artrite reumatoide e osteoartrite (PAINO et al., 2011)

Com relação às EROs, estes são compostos altamente instáveis, gerados fisiologicamente pelo metabolismo celular, pela redução incompleta do oxigênio molecular (O_2). As EROs consistem de moléculas que apresentam elétrons desemparelhados, como o ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil ($\cdot OH$), ou ainda de moléculas com características pró-oxidantes, como o H_2O_2 , o $ONOO^-$ e o $HClO$ (BOUEIZ; HASSOUN, 2009).

Durante a resposta inflamatória, as EROs são geradas em grande quantidade, predominantemente pela enzima NADPH oxidase. Nos neutrófilos, esta enzima está primeiramente inativa, tanto no citosol como na membrana plasmática. Quando ocorre a ativação celular, os componentes citosólicos da NADPH oxidase, como por exemplo, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ e $p40^{phox}$, deslocam-se principalmente para a superfície dos grânulos, onde se tornam cataliticamente ativos, desencadeando o processo de *burst* respiratório, com grande liberação destas espécies reativas (GEERING; SIMON, 2011). Uma vez que as EROs têm sido detectadas tanto no meio extra como intracelular, há evidências de que elas desempenham papel importante na sinalização celular em diferentes processos, como a apoptose, via indução da liberação de catepsina D dos grânulos azurófilos, levando à ativação das caspases 8 e/ou 3, em neutrófilos (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007; GEERING; SIMON, 2011).

Com o estresse oxidativo e a consequente geração de grandes quantidades tanto de EROs, como de ERNs, como por exemplo, $ONOO^-$ e NO e $O_2^{\cdot-}$, ocorre a indução da apoptose em diversas células, incluindo os neutrófilos (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007). Da mesma forma, substâncias antioxidantes, como a n-acetilcisteína e a enzima catalase (CAT), assim como o processo de hipóxia retardaram o processo de apoptose celular (SCHEEL-TOELLNER et al., 2004).

Diferentes doenças inflamatórias são dependentes da produção de EROs. Estudos demonstraram que, em pacientes com doença de Parkinson, ocorre aumento na produção de EROs, principalmente pela enzima NADPH oxidase por células da micrógliia (PETERSON; FLOOD, 2012). Ainda, Beltrán e colaboradores (2010) evidenciaram aumento na produção de EROs, como o H_2O_2 por células imunes de pacientes com doença inflamatória intestinal. Entretanto, a deficiência de EROs pode levar também a um efeito deletério no organismo. Por exemplo, pacientes com doença

granulomatosa crônica (CGD), uma imunodeficiência primária, caracterizada pela deficiência na expressão da NADPH oxidase, normalmente apresentam infecções bacterianas e/ou fúngicas recorrentes (BASSIRI-JAHROMI; DOOSTKAM, 2011).

Durante o processo inflamatório, ocorre a ativação de diferentes fatores de transcrição, tanto em células mononucleares, como em neutrófilos, como o fator de transcrição nuclear de células T ativadas (NF-AT) e a família de fatores de transcrição Rel/NF- κ B (VALLABHAPURAPU; KARIN, 2009). Dentre os fatores de transcrição mais estudados, pode-se destacar o NF- κ B, que desempenha papel fundamental na resposta inflamatória, bem como medeia a expressão gênica de moléculas diretamente envolvidas nos processos de sobrevivência, diferenciação e proliferação celular.

Contudo, apesar de apresentar diferentes efeitos em condições fisiológicas, a desregulação deste fator de transcrição tem sido descrita em inúmeras doenças, como câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, diabetes e doenças autoimunes (HAYDEN; GHOSH, 2012). Dentre estas doenças, pode-se destacar a artrite reumatoide, na qual o NF- κ B desempenha papel central na patogênese, uma vez que a ativação deste fator de transcrição já foi descrita no modelo de artrite induzida por colágeno, em ratos, bem como em pacientes com artrite reumatoide (LIU; LI; SHEN, 2010; LI et al., 2010).

Em células em repouso, o NF- κ B permanece retido no citosol, pela ligação a um grupo de proteínas inibitórias, conhecidas como I κ Bs, podendo-se destacar I κ B- α , I κ B- β e I κ B- ϵ . Estas proteínas inibem a translocação do NF- κ B para o núcleo, inibindo, desta forma, a síntese de mediadores, dentre eles aqueles de caráter pró-inflamatório, como IL-1 β , TNF- α , IL-6, COX-2 e iNOS (VALLABHAPURAPU; KARIN, 2009). Em células ativadas, as proteínas I κ Bs são fosforiladas pelas IKKs, levando à degradação destas pelo proteossoma, promovendo então a transmigração do NF- κ B para o núcleo, induzindo, desta forma, à síntese desses mediadores pró-inflamatórios (VALLABHAPURAPU; KARIN, 2009; HAYDEN; GHOSH, 2012).

As principais citocinas pró-inflamatórias secretadas pelas células fagocíticas ativadas incluem a IL-1 β e o TNF- α . Estas citocinas, liberadas por leucócitos ativados, macrófagos residentes e células endoteliais, induzem a expressão de moléculas de adesão no

endotélio, como por exemplo, ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, facilitando a transmigração e a infiltração leucocitária no sítio da lesão (KUMAR et al., 2009).

Além disso, tanto a IL-1 β como o TNF- α induzem à fagocitose de patógenos por neutrófilos e macrófagos, além de promover a liberação de EROs e ERNs (NETEA et al., 2010).

A IL-1 β é uma citocina com atividade pró-inflamatória, sendo produzida e liberada principalmente por monócitos e macrófagos (DINARELLO et al., 2011a). Esta é formada a partir da pró-IL-1 β , um precursor inativo desta citocina, em resposta ao reconhecimento de padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs) (EDER, 2009; LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011).

Esta citocina ativa a liberação de TNF- α pelos macrófagos, células endoteliais, linfócitos e fibroblastos, e é capaz de induzir a liberação da citocina IL-6 pelos macrófagos e hepatócitos (DINARELLO, 2011a). Tanto o TNF- α como a IL-1 β estimulam a produção e a liberação de IL-8, uma importante quimiocina responsável pela quimiotaxia de neutrófilos (MONTESEIRIN, 2009). A IL-1 β está ainda envolvida em diversas doenças de caráter inflamatório, dentre elas citam-se doenças metabólicas, como o diabetes tipo 2 e a síndrome metabólica (MAEDLER et al., 2011), doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico (DAVIS; HUTCHESON; MOHAN, 2011), doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (SHAFTEL; GRIFFIN; O'BANION, 2008) e doenças inflamatórias, como a osteoartrite e a artrite reumatoide (DINARELLO, 2011a,b).

O TNF- α é liberado principalmente por macrófagos ativados, monócitos, neutrófilos, linfócitos T e células NK, e atua pela ligação a dois receptores, o TNFR1, expresso na grande maioria das células nucleadas e o TNFR2, expresso principalmente por linfócitos e também por células endoteliais. A ligação do TNF- α a seus receptores desempenha papel crucial nos processos de expressão gênica, morte celular, inflamação e câncer (PARAMESWARAN; PATIAL, 2010; WALCZAK, 2011). Esta citocina, além de induzir a liberação de outras citocinas, como IL-1 β , promove a ativação do NF- κ B, que, por sua vez, induz novamente à síntese e à liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios em um processo de retroalimentação (VALLABHAPURAPU; KARIN, 2009; HAYDEN; GHOSH, 2012). Como consequência, ocorre também a expressão de moléculas de

adesão no endotélio e nos leucócitos o que denota na quimiotaxia celular do vaso para o tecido lesado (KUMAR; SHARMA, 2010; PHILLIPSON; KUBES, 2011).

Estudos têm demonstrado a participação do TNF- α em diversas doenças de caráter inflamatório, como o lúpus eritematoso sistêmico (FARID et al., 2011), a colite ulcerativa (SANDBORN et al., 2012) a sepse (QIU et al., 2011), o diabetes (UNO et al., 2007; FLYVBJERG, 2010), a obesidade (TZANAVARI; GIANNOGONAS; KARALIS, 2010), a aterosclerose (ZHANG et al., 2007), a psoríase (CHANNUAL; WU; DANN, 2009) e a artrite reumatoide (TOUSSIROU; WENDLING, 2007; SIMSEK, 2011; MARKATSELI et al., 2012).

No presente estudo, foram utilizados diferentes classes de fármacos, com o objetivo de conter a resposta inflamatória. Com relação a estes fármacos, pode-se destacar os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs). Esta classe de fármacos atua inibindo a síntese da prostaglandina E₂ (PGE₂) a partir do ácido araquidônico, pela inibição das enzimas ciclooxigenases (COX) (Figura 3). A PGE₂ é um mediador lipídico presente em doenças de caráter inflamatório, como a artrite reumatoide e a osteoartrite, além de doenças inflamatórias cutâneas (SU et al., 2010).

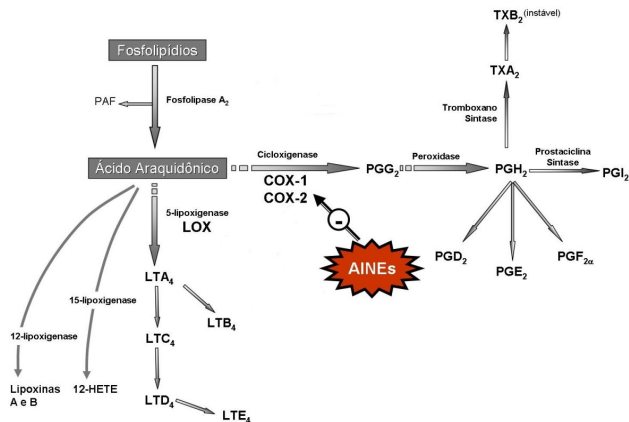


Figura 3: Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).
 Fonte: <http://dc152.4shared.com/img/t9Um3PnC/preview.html>; acesso em 27/03/2012.

Outra classe de fármacos utilizadas no presente estudo com o intuito de controlar o processo inflamatório, foi a dos glicocorticoides (GCs). Estes anti-inflamatórios esteroidais são amplamente utilizados no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes, assim como em transplante de órgãos e no câncer, uma vez que possuem um efeito imunossupressor e anti-inflamatório, dependendo da concentração utilizada (DE BOSSCHER; HAEGEMAN; ELEWAUT, 2010). O efeito imunomodulatório promovido por estes fármacos ocorre principalmente via ativação do receptor de glicocorticoides (GR), levando à modulação de fatores de transcrição, como NF- κ B, AP-1 e de transdutores de sinal ativadores de transcrição (STATs) (KINO; SU; CHROUSOS, 2009; WHITEHOUSE, 2011) (Figura 4).

Ainda, em determinados grupos de células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos alveolares, ocorrem efeitos não-genômicos, consequentes à estimulação do GR pelos GCs, como por exemplo, a síntese de grandes quantidades de mediadores anti-inflamatórios, como a anexina-1, também conhecida como lipocortina-1, que inibe a atividade da enzima PLA₂, inibindo desta forma, a formação de ácido araquidônico e, consequentemente de prostaglandinas por estas células (KAMAL; FLOWER; PERRETTI, 2005; LIM; PERVAIZ, 2007) (Figura 4).

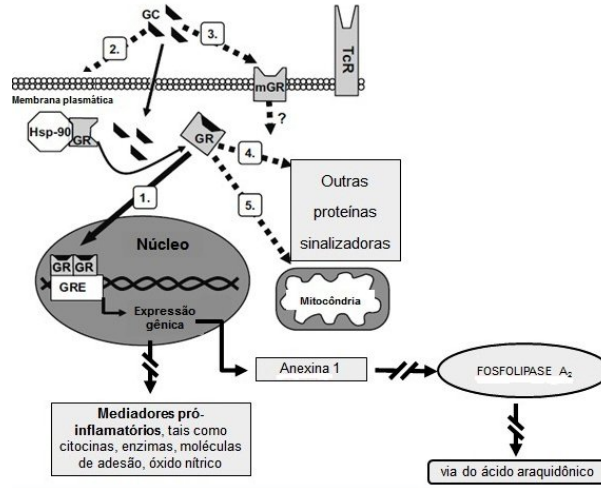


Figura 4: Mecanismo de ação dos glicocorticoides (GCs). Fonte: Modificado de Boldizar e colaboradores (2010).

Para a avaliação do efeito anti-inflamatório *in vivo* de diferentes fármacos e plantas, há vários modelos de inflamação descritos, como a pleurisia, o edema de pata, a artrite, o implante de esponjas embebidas em agentes irritantes, a bolsa de ar, entre outros (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985).

No presente estudo optou-se pelo modelo de inflamação induzida pela carragenina na bolsa de ar em camundongos, uma vez que esta técnica já estava padronizada em nosso laboratório, é altamente reprodutível, permite a quantificação de diferentes parâmetros inflamatórios, como migração celular, extravasamento de proteínas plasmáticas (exsudação), concentrações de diversos mediadores pró-inflamatórios, além de possibilitar a coleta de células para a realização de experimentos *ex vivo*. Este modelo foi descrito primeiramente por Okudaira e Schuwarz (1962), em ratos, e posteriormente foi padronizado em camundongos por Clark (1975).

Atualmente, estudos têm considerado que o modelo da inflamação induzida pela carragenina na bolsa de ar mimetiza o processo inflamatório que ocorre na sinóvia de pacientes com artrite reumatoide, uma vez que, na cavidade sinovial, há a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, como NO, IL-1 β , TNF- α ,

proteína inflamatória de macrófago-1 β (MIP-1 β), entre outros (LIZ et al., 2011; DUARTE; VASKO; FEHRENBACHER, 2012).

Posteriormente, optou-se por elucidar o mecanismo de ação anti-inflamatória do extrato bruto hidroalcoólico (EBH), da fração alcaloide (Alc) e do composto isolado di-hidrocorinanteol (DHC) obtidos das raízes da *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

Uma vez que o efeito anti-inflamatório observado para o material vegetal *in vivo* foi, essencialmente, à custa da inibição da migração e ativação de neutrófilos, optou-se por estudar o mecanismo de ação da planta em questão especificamente sobre estas células do sistema imune.

Para isto, decidiu-se trabalhar com neutrófilos, uma vez que estas são as principais células envolvidas na inflamação induzida pela carragenina, no modelo experimental da bolsa de ar. Além disso, diversos estudos evidenciaram que os neutrófilos são essenciais na resposta inflamatória presente em inúmeras doenças, como asma (MONTESEIRÍN, 2009), doença de Alzheimer (NEHER; NENISKYTE; BROWN, 2012), osteoartrite e artrite reumatoide (PAINO et al., 2011).

Modelos utilizando neutrófilos *in vitro* permitem avaliar diferentes funções exercidas por estas células, como o processo de apoptose celular, além da fagocitose, adesão e degranulação, bem como a produção de EROs e de citocinas/quimiocinas pelas células neutrofílicas, entre outras.

Desta forma, optou-se por avaliar o mecanismo de ação anti-inflamatório do EBH, fração Alc e composto DHC sobre as diferentes funções de neutrófilos humanos, *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito e o mecanismo de ação anti-inflamatória do extrato bruto hidroalcoólico, frações, subfrações e compostos isolados da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

3. ESTUDOS *IN VIVO*

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Estudar o efeito do material vegetal sobre a migração de leucócitos e a exsudação;
- II. Verificar o efeito do material vegetal sobre as concentrações da mieloperoxidase (MPO) e da adenosina-desaminase (ADA);
- III. Analisar o efeito do material vegetal sobre as concentrações de nitrito/nitrato (NO_x), interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) e fator de necrose tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$);
- IV. Verificar o efeito do material vegetal sobre a degradação da proteína inibitória kappa B-alfa ($\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$).

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Coleta do material vegetal

As cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. foram coletadas pela Dra. Danielle Fontana Pereira no Estado do Mato Grosso, município de Arenápolis. A identificação da espécie foi realizada pela bióloga Dra. Celice Alexandre, na Universidade Estadual do Mato Grosso (UNEMAT – Campus Tangará da Serra/MT). A exsicata do material vegetal foi depositada no herbário da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT – Cuiabá/MT) sob número de registro 38639.

3.2.2. Obtenção do extrato, frações, subfrações e compostos isolados

O extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (290 g) foi obtido a partir das cascas secas (9 kg) da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. por maceração com etanol a 90% (24 h x 3). Parte do EBH (100 g) foi submetido ao processo de partição líquido-líquido com *n*-hexano e acetato de etila, resultando nas frações *n*-hexano (Hex) (9,9 g) e acetato de etila (AcOEt) (22 g), respectivamente. Outra parte do EBH (20 g) foi fracionada com acetato de etila e solução de ácido clorídrico (HCl) a 5%. A fração presente na fase ácida teve o pH ajustado para 9-10 com solução de amônia (NH₃) a 10% e foi extraída com acetato de etila, resultando na fração alcaloide (Alc) (5 g). Ainda, a fração Alc foi submetida a um processo de partição sólido-líquido com éter etílico, resultando em duas subfrações com diferentes polaridades, denominadas subfrações polar (Pol) (3,6 g) e apolar (Apol) (1,4 g). Parte da subfração Apol (1 g) foi adicionada a coluna de sílica gel 60 CC (Vetec – 0,063-0,2) e submetida a eluição com clorofórmio (CHCl₃), seguida por proporções crescentes de metanol (CH₃OH) / CHCl₃, resultando em 54 frações. O beta-sitosterol (β-Sit) foi identificado como cristais incolores, com ponto de fusão entre 133 e 135°C nas frações 2 a 5 (15 mg) e o di-hidrocorinanteol (DHC) foi identificado como compostos amorfos, com ponto de fusão entre 173 e 176°C, principalmente nas frações 10 a 15 (70 mg).

3.2.3. Isolamento dos compostos da *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

Primeiramente, foi realizada cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com auxílio do equipamento Varian ProStar[®] 310 com detector ultravioleta/visível (UV/Vis) (monitoramento a 282 nm) (Walnut Creek, Califórnia, E.U.A.) e um injetor manual, com auxílio do programa StarFinder[®] versão 5,5. Para a técnica de HPLC, foi utilizada coluna C18 ChromSpher 5 (4,6 mm x 250 mm i.d.) (Walnut Creek, Califórnia, E.U.A.). Tampão fosfato (10 mM) (A) e acetonitrila (B) foram utilizados como fase móvel, com um fluxo de eluição de 0,75 mL por minuto, de acordo com o gradiente de eluição: 0-17 minutos, ponto isocrático, 65% do solvente A e 35% do solvente B; 17-25 minutos, gradiente linear, 50% do solvente A e 50% do solvente B. O período de equilíbrio de 10 minutos foi utilizado entre as corridas, que foram realizadas a temperatura ambiente.

O composto majoritário (DHC) foi isolado a partir da subfração Apol (1 g), por meio de cromatografia em coluna com sílica gel 60 CC (Vetec-0,063-0,2 mesh).

Os experimentos de separação e otimização foram conduzidos por meio do sistema de eletroforese capilar HP^{3D}CE (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A), equipado com um detector diodo a 215 nm, à temperatura constante de 25°C. Os dados foram obtidos e processados pelo programa HP ChemStation[®]. As amostras de EBH, frações (*n*-hexano, acetato de etila e alcaloide) e subfrações (Pol e Apol) foram injetadas hidrodinamicamente (50 mbar por 3 s) e o sistema eletroforético foi operado em condições normais de polaridade e voltagem constante de +30 kV. Para todos os experimentos, foi utilizado capilar de sílica fundida (Polymicro, Phoenix, AZ, E.U.A.) 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo) x 50 µm de diâmetro interno x 375 µm de diâmetro externo.

A benzilamina foi utilizada como controle interno. Os resultados foram expressos como porcentagem considerando a massa total do composto majoritário em relação à massa do EBH, frações e subfrações (% m/m).

3.2.4. Elucidação estrutural dos compostos isolados da *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

A estrutura química de cada composto isolado foi determinada com base em suas características físicas, dados espectroscópicos por análise de infravermelho (Perkin-Elmer FTIR 16 PC, Beaconsfield, Inglaterra) e de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C) (Varian AS-400, Palo-Alto, Califórnia, E.U.A.), com espectrômetro operando a 400 e 100 MHz, respectivamente. Ainda, realizou-se cromatografia de camada delgada (CCD) em placas de sílica gel 60 F254 (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Finalmente, as estruturas dos compostos isolados foram confirmadas por comparação com dados previamente relatados na literatura (MASSARIOT et al., 1987; KOELZER et al., 2009; RANI et al., 2010; ZARROUK et al., 2010).

Ainda, foi empregada espectroscopia de massa com ionização eletrospray (ESI-MS) $[\text{M} + \text{H}]^+$ com o objetivo de auxiliar na elucidação da estrutura do composto majoritário presente tanto no EBH, como nas frações e subfrações isoladas das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Este sistema consiste de um espectrômetro de massa híbrido com captura de íons linear/triplo-quadrupolo QTrap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canadá), acoplado a uma bomba de infusão 11 Plus (Holliston, MA, E.U.A.) para infusão da amostra.

A espectrometria de massa foi calibrada nos modos de íons negativos e positivos por infusão com solução de polipropilenoglicol. Os experimentos foram conduzidos utilizando fonte TurbolonSpray[®] (ionização eletrospray) no modo íons positivos. A tensão aplicada ao capilar foi de 5500 V e o potencial de desagregação foi mantido a 56 V. Ar sintético ultrapuro foi utilizado como gás nebulizador (GS1) com pressão de 15 psi. Nitrogênio a 10 psi foi utilizado na interface como gás de dessolvatação. Uma solução da amostra de DHC foi diluída a 5,0 mg/mL em uma solução metanol/água (50/50, v/v) e infundida em uma taxa de 10 mL/min.

3.2.5. Animais

Camundongos albinos suíços foram utilizados nos experimentos e acondicionados a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) com um ciclo de luz claro/escuro em períodos de 12 h, umidade 50-60% e foram alimentados com ração e água *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - PP00294/CEUA) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.2.6. Protocolo experimental

Neste protocolo experimental, diferentes grupos de animais receberam uma injeção de 1,5 mL de ar por três dias alternados para induzir a formação da bolsa de ar. No sexto dia, os animais receberam carragenina (Cg a 1%), um agente flogístico amplamente utilizado em modelos experimentais de inflamação (BRITO et al., 1989). Após 24 h da administração da Cg por via subcutânea (s.c.), os animais foram eutanasiados por meio de overdose de pentobarbital (180 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Estes foram fixados em uma mesa cirúrgica e foi realizada uma incisão na região dorsal para a perfuração da bolsa. A cavidade da bolsa de ar foi lavada com 1,0 mL de PBS estéril (pH 7,6, composição mM: NaCl 130, Na_2HPO_4 5, KH_2PO_4 1, em água destilada contendo heparina (20 UI/mL) (BENINCÁ et al., 2007). A determinação da migração celular, exsudação, concentrações das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-desaminase (ADA), bem como as concentrações de nitrato/nitrito (NO_x), interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) foram avaliados 24 h após a indução da inflamação pela Cg. A indometacina (Indo) (5 mg/kg) e a dexametasona (Dexa) (0,5 mg/kg) foram utilizados como fármacos de referência e foram administrados por via i.p. 0,5 h antes da indução da inflamação pela Cg.

Para o estudo da curva dose-resposta, diferentes grupos de animais foram tratados (0,5 h antes) com diferentes doses de EBH (100-400 mg/kg), Hex (5-50 mg/kg) AcOEt (10-50 mg/kg), Alc (5-50 mg/kg), Pol (2-10 mg/kg), Apol (1-5 mg/kg), DHC (0,5-2 mg/kg) ou β -Sit (0,5-2 mg/kg) por via i.p.. A migração celular e a exsudação foram analisadas 24 h após a administração de Cg.

Em outros experimentos, para estabelecer o perfil temporal, diferentes grupos de animais foram tratados previamente com uma das

doses descritas anteriormente em diferentes períodos de tempo (0,5, 1 ou 2 h) e os mesmos parâmetros inflamatórios foram avaliados 24 h após a indução da inflamação. De acordo com os resultados as doses de EBH (200 mg/kg), Hex (10 mg/kg), AcOEt (25 mg/kg), Alc (10 mg/kg), Pol (10 mg/kg), Apol (1 mg/kg), DHC (1 mg/kg) ou β -Sit (1 mg/kg), administrados 0,5 h antes da Cg foram utilizadas para a análise do material vegetal sobre as concentrações de MPO, ADA, NO_x , IL-1 β e TNF- α .

3.2.7. Contagem total e diferencial de leucócitos

No dia dos experimentos, após a morte dos animais e abertura das cavidades, alíquotas do lavado da bolsa de ar (200 μL) foram reservadas para a contagem total de leucócitos, utilizando-se líquido de Türk (1:20) e câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico comum (aumento 400 vezes). Os esfregaços celulares foram realizados para a contagem diferencial dos leucócitos. Após o preparo dos esfregaços em citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, E.U.A.), estes foram corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (neutrófilos e mononucleares) também foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

3.2.8. Coloração dos esfregaços celulares

A metodologia consiste na coloração sucessiva com uma mistura de eosinato de azul-de-metileno (May-Grünwald) e de azul-eosina (Giemsa). As lâminas contendo o sedimento celular dos lavados da bolsa de ar foram centrifugadas em citocentrífuga (Cytopro® cytocentrifuge Wescor, modelo: 7620, E.U.A.) e secas em posição horizontal a temperatura ambiente. Em suporte de coloração apropriado, as lâminas foram cobertas com 1 mL do corante May-Grünwald e mantidas em contato com o sedimento celular por 2 minutos. A seguir adicionou-se água deionizada (1 mL), com auxílio de pipeta automática com capacidade de 1 mL. Após 3 minutos, o corante foi removido e cobriu-se a lâmina com o corante Giemsa (diluído 1:20 em água deionizada) por 15 minutos. A seguir, as

lâminas foram lavadas com água deionizada e secas à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em número total de células $\times 10^6$.

3.2.9. Determinação da exsudação

Para avaliação indireta da exsudação os animais receberam o corante azul de Evans (25 mg/mg) por via endovenosa (e.v.) 10 min após a indução da inflamação. Em seguida, 24 h após a administração da Cg, os animais foram eutanasiados por overdose de pentobarbital (180 mg/kg, i.p.) e uma alíquota (200 μ L) do lavado da bolsa de ar foi reservada para a determinação da concentração de azul de Evans com auxílio de uma leitora de microplacas de enzimmunoensaio (ELISA) (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, E.U.A.) para leitura da densidade óptica, em comprimento de onda 620 nm, de acordo com a metodologia descrita por Saleh, Calixto, Medeiros (1996). Para a quantificação das concentrações de azul de Evans, curvas padrão com concentrações previamente conhecidas deste corante (0,1 - 25 μ g/mL) tiveram suas densidades ópticas determinadas em 620 nm, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em μ g/mL, com o auxílio da equação da reta.

3.2.10. Determinação das concentrações da mieloperoxidase

Neste grupo de experimentos, imediatamente após a morte dos animais, uma amostra do lavado da bolsa de ar foi coletada e processada para a quantificação das concentrações da enzima MPO. Volumes de 20 μ L do lavado da cavidade da bolsa de ar ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos (0,7 - 140 mU/mL)) foram transferidos para as placas de ELISA e a reação enzimática iniciada com a adição de 180 μ L de solução (0,167 mg/mL de o-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H_2O_2). Após 15 minutos de incubação, à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de 30 μ L de azida sódica (1%) (RAO et al., 1993). Em seguida, as placas contendo as amostras foram lidas em leitora de microplacas de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, E.U.A.) em 450 nm. Curvas-padrão com concentrações conhecidas da MPO (0,7 - 140 mU/mL) também tiveram suas densidades ópticas determinadas, permitindo a

quantificação dos valores desconhecidos. Os valores das concentrações da MPO foram expressos em mU/mL, com o auxílio da equação da reta.

3.2.11. Determinação das concentrações da adenosina-desaminase

Inicialmente, amostras com concentrações conhecidas (volume final 2500 μ L) de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e NH_3SO_4 (15 mM) foram preparadas para a obtenção de uma curva-padrão (10-50 U/L). As amostras do lavado da bolsa de ar contendo a enzima adenosina-desaminase (ADA) (20 μ L) foram transferidas para cubetas e a reação enzimática iniciou-se com a adição da solução de tampão fosfato (pH 6,5, 500 μ L, composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e adenosina (0,5 mM)). Após período de incubação de 1 h a 37°C, a reação foi bloqueada pela adição da solução (1000 μ L) de fenol (1 mM), nitroprussiato de sódio (0,17 mM) e tampão fosfato (1000 μ L: NaOCl : 11 mM) (GIUSTI; GALANTI, 1984). Esta solução também foi adicionada às cubetas contendo as diferentes concentrações da curva-padrão (volume final 2500 μ L). As absorbâncias das amostras foram lidas em leitora de microplacas de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, E.U.A.) em 620 nm. As concentrações da enzima ADA foram determinadas e expressas em U/L, com auxílio da equação da reta.

3.2.12. Determinação das concentrações de nitrato/nitrito

O NO foi quantificado por meio da formação de seus metabólitos: nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), utilizando-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982). As amostras do lavado da bolsa de ar (300 μ L) foram submetidas à desproteíntização com 20 μ L de solução de sulfato de zinco a 20%. Estas foram incubadas em banho de gelo por 60 minutos. As amostras foram centrifugadas (2.500 rpm por 15 minutos), obtendo-se um sobrenadante límpido. A seguir, 100 μ L do sobrenadante foram transferidos para uma cubeta e diluídos em solução contendo 200 μ L de cloreto de vanádio (VaCl_3) (0,8%) (p/v) e HCl (3%) (p/v). Nesta mesma cubeta foram adicionados 300 μ L de solução de Griess: sulfanilamida (1%) (p/v), ácido fosfórico (5%) (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v) e incubados durante

40 minutos, a 37°C (MIRANDA et al., 2001). A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades ópticas em leitora de microplacas de ELISA (Organon - Tecknica, Roseland, New Jersey, E.U.A.) em 540 nm. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de NO_2^- (0-150 μM) também tiveram suas densidades ópticas determinadas, permitindo desta forma, com auxílio da equação da reta, a quantificação das concentrações de nitrato/nitrito no lavado da bolsa de ar, em μM .

3.2.13. Determinação da degradação da proteína inibitória kappa B-alfa

Para a avaliação da degradação da proteína I κ B- α , amostras do lavado da cavidade da bolsa de ar foram coletadas e incubadas a 37°C por 30 min com solução salina balanceada de Hanks (HBSS), contendo: dimetilsulfóxido (DMSO 1%) (controle negativo), EBH (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Hex (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), AcOEt (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Alk (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Pol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Apol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DHC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou β -Sit (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), em um volume final de 100 μL . A seguir, a estimulação foi interrompida adicionando-se tampão Laemmli (4x) (35 μL), conforme descrito por Girard e colaboradores (1995) e Pelletier e colaboradores (2001). Amostras correspondentes a 1×10^6 céls/mL foram transferidas para um gel de eletroforese com paracrilamida-dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10% e transferidos posteriormente para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ., E.U.A.). Sítios não-específicos foram bloqueados com albumina sérica bovina a 3% em tampão TBS-Tween (25 mM Tris-HCl, pH 7,8, 190 mM NaCl, 0,15% Tween-20) e a reação de Western blot foi realizada conforme descrito por Pelletier e colaboradores (2002). O anticorpo primário monoclonal anti-I κ B- α de camundongos (Santa Cruz Biotechnology, CA, E.U.A.) na diluição de 1:200 foi incubado *overnight* com as membranas. Posteriormente, estas foram lavadas 3 vezes com TBS-Tween e foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário de cabra anti-camundongo (IgM + IgG) conjugado à peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, E.U.A.) na diluição de 1:20.000, contendo leite em pó desnatado a 3%. Ainda, as membranas foram incubadas com o tampão *Stripping* (100 mM 2-

mercaptoetanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris, pH 6,7) para extração dos anticorpos aderidos. As membranas foram novamente lavadas 3 vezes com TBS-Tween e incubadas com novo anticorpo primário anti- β -tubulina de camundongos (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, E.U.A.), seguido por lavagens sucessivas com TBS-Tween e por nova incubação com anticorpo secundário de cabra anti-camundongo (IgM + IgG) (1:20.000) conjugado à peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, E.U.A.). Por ser uma proteína constitutiva, a beta-tubulina (β -tub) foi utilizada como controle positivo da reação. A degradação de I κ B- α foi determinada com auxílio de um revelador quimiluminescente. Os resultados foram expressos pela comparação de intensidade de banda com o controle positivo β -tub.

3.2.14. Determinação das concentrações de interleucina-1 beta e fator de necrose tumoral-alfa

Neste grupo de experimentos, imediatamente após a morte dos animais, amostras do lavado da bolsa de ar foram coletadas e processadas para a realização da técnica de ELISA fase sólida, método sanduíche. Neste protocolo foram utilizados anticorpos específicos. Padrões com concentrações conhecidas foram também realizados de acordo com as instruções dos fabricantes, IL-1 β (Immuno Biological Laboratories Co. Ltd. Japan - Cat. № 27193) e TNF- α (BD - Biosciences Pharmingen, São Diego, Califórnia, E.U.A. - Cat. № 559732).

As sensibilidades identificadas dos kits foram: IL-1 β = 1,67 pg/mL e TNF- α = 5,00 pg/mL. Os coeficientes de variação (CV) intra e interensaios observados foram: CV intra: IL-1 β = $6,2 \pm 0,4\%$ e TNF- α = $7,8 \pm 0,9\%$; CV inter: IL-1 β = $5,1 \pm 0,6\%$ e TNF- α = $9,6 \pm 2,1\%$. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de IL-1 β (11,72 – 750,00 pg/mL) e TNF- α (5,00 – 2.300,00 pg/mL) também tiveram suas densidades ópticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta. As leituras das citocinas IL-1 β e TNF- α e suas respectivas curvas-padrão foram realizadas em leitora de microplacas de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, E.U.A.) em 450 nm. Os valores foram expressos em pg/mL.

3.2.15. Fármacos e reagentes

Para os estudos *in vivo*, foram utilizados os seguintes reagentes: dexametasona (Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil), carragenina- λ (grau IV), hidróxido de sódio (NaOH), mieloperoxidase de neutrófilos humanos, indometacina, o-dianisidina 2HCl (3,3'-dimetoxibenzidina), azida sódica, sulfato de cobre (penta-hidratado) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ácido tartárico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{K}_2$), dodecil sulfato de sódio (SDS), solução fenólica Folin & Ciocalteu's, cloreto de vanádio (III) (VCl_3), sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, E.U.A.), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30 %) (Biotech, São Paulo, SP, Brasil), adenosina ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$) (Fluka, Ronkonkoma, Nova York, E.U.A.), heparina (Liquemine®, Roche, São Paulo, SP, Brasil), fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), sulfato de zinco (ZnSO_4) (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), nitroprussiato de sódio ($\text{C}_5\text{FeN}_5\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil), sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (Labsynth, São Paulo, SP, Brasil), carbonato de sódio (Na_2CO_3) (MicroBioquímica, Lorena, SP, Brasil), HCl (Synth, Diadema, SP, Brasil), líquido de Türk, May-Grünwald (Newprov, Pinhais, PR, Brasil), Giemsa (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), Azul de Evans ($\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{S}_4\text{Na}_4$) (Acros-Organics, Geel, Antwerp, Belgium); di-hidrocloro de N-(1-naftil)-etilenodiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$) (Merck, Frankfurter, Darmstadt, Alemanha). Kits de enzima-imunoenensaio (ELISA) para quantificação de IL-1 β de camundongos (IBL: Immunobiological laboratories Co. Ltd., Fujioka, Gunma, Japão) e de TNF- α de camundongos (BD - Biosciences Pharmingen, São Diego, Califórnia, E.U.A.). Anticorpo monoclonal anti-I κ B- α de camundongos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, E.U.A.), anticorpo monoclonal anti- β -tubulina de camundongos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.), anticorpo de cabra anti-camundongos (IgM + IgG) conjugado à peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, E.U.A.). Tris-HCl, NaCl, Triton X-100, e SDS foram adquiridos de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Outros sais com grau de pureza analítica foram adquiridos por diferentes fontes comerciais.

3.2.16. Análise estatística

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados *in vivo* (migração celular, exsudação, MPO, ADA, NO_x, IL-1 β , TNF- α e I κ B- α) foram expressos utilizando-se a média \pm erro padrão da média (E.P.M.), e estes resultados foram analisados pelo programa de estatística GraphPad Prism[®] versão 5,01 (San Diego, CA, E.U.A.). As diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e tratados com o material vegetal foram realizados por meio do teste de variância ANOVA (teste paramétrico) bicaudal. Quando necessário utilizou-se o teste *t* de Student (não-pareado). Para todas as análises estatísticas, valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Análise fitoquímica

O fracionamento da subfração Apol das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. resultou em um alcaloide indólico e um esteroide, que ainda não haviam sido relatados para esta espécie: composto 1: dihidrocorinanteol (DHC) (Figura 5A) e composto 2: beta-sitosterol (β -Sit) (Figura 5B). Os compostos foram identificados por métodos espectroscópicos, como ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C, ou ainda por comparação com dados na literatura (MASSIOT et al., 1987; KOELZER et al., 2009).

3.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência da *Esenbeckia leiocarpa*

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para o EBH, a fração Alc e a subfração Apol foi avaliada a 282 nm (Figura 6). O perfil cromatográfico do EBH demonstrou a presença de um pico significativo, com um tempo de retenção de 20,71 minutos, representando 9,36% da área total deste cromatograma (Figura 6A). Um segundo cromatograma foi obtido para a fração Alc, e demonstrou a presença de um pico majoritário, com o mesmo tempo de retenção (20,71 minutos), representando 48,22% da área total do cromatograma em questão (Figura 6B). Um terceiro cromatograma,

relativo à subfração Apol confirmou a presença de um pico majoritário com o mesmo tempo de retenção do EBH e da fração Alc (20,71 minutos), representando 56,07% da área total deste cromatograma (Figura 6C). Este pico, presente tanto no EBH, como na fração Alc e na subfração Apol foi identificado como DHC (Figura 5A). Ainda, o β -Sit (Figura 5B) também foi isolado da subfração Apol, contudo, no comprimento de onda de 210 nm.

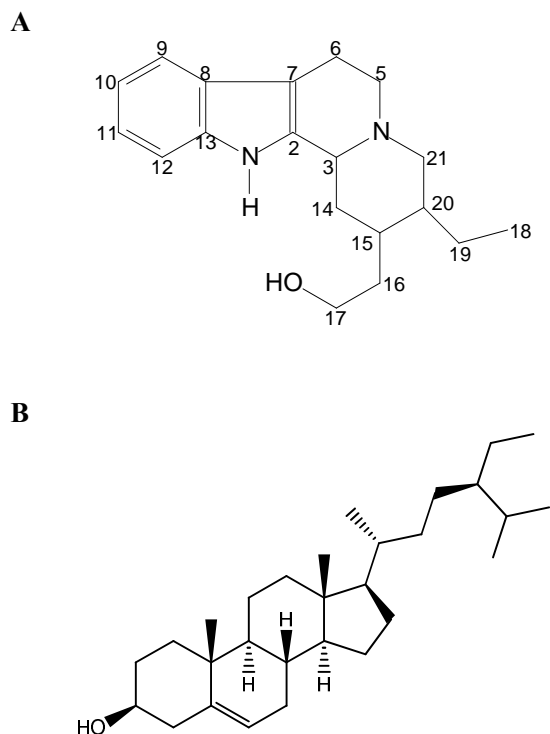


Figura 5: Estrutura química do composto 1: di-hidrocorinanteol (DHC) (A) e do composto 2: beta-sitosterol (β -Sit) (B) isolados da subfração apolar das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

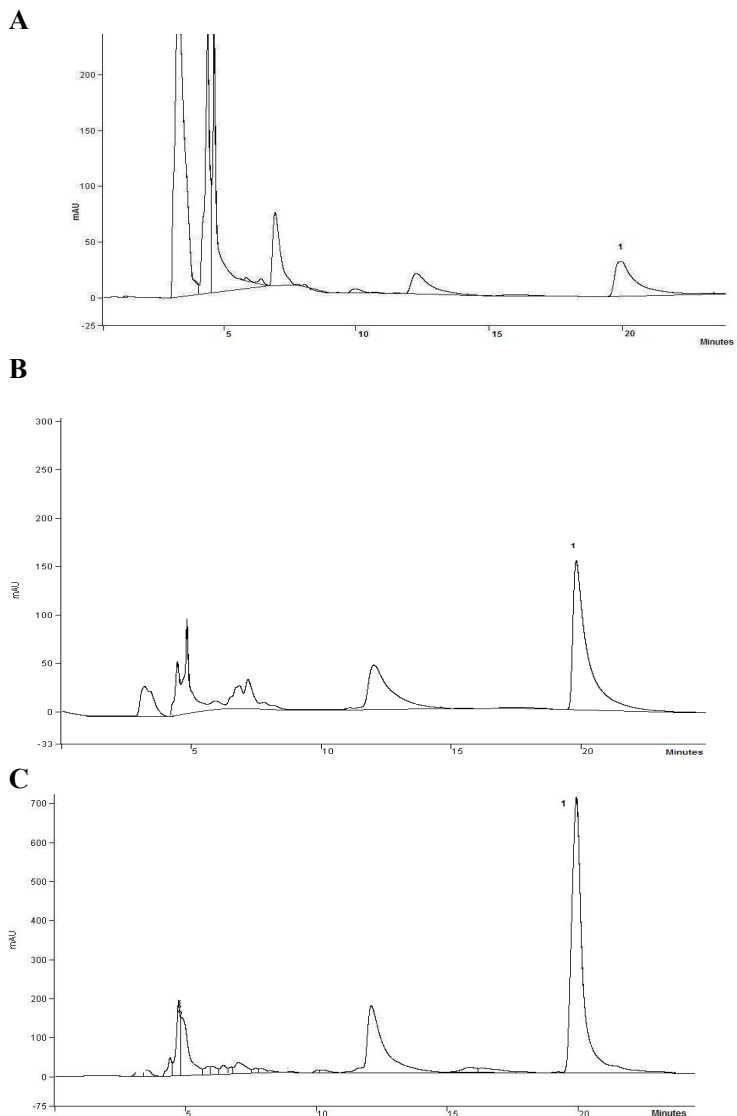


Figura 6: Perfil cromatográfico (HPLC) do extrato bruto hidroalcoólico (A), fração alcaloide (B) e subfração apolar (C) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. O pico 1 representa o composto majoritário, identificado como di-hidrocorinanteol (DHC).

3.3.3. Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a migração de leucócitos e a exsudação

O EBH extraído das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. reduziu a migração de leucócitos (200 mg/kg: $30,7 \pm 7,7\%$ e 400 mg/kg: $48,4 \pm 9,3\%$) ($P < 0,01$) (Figura 7A), de neutrófilos (EBH: 200 mg/kg: $43,9 \pm 10,9\%$ e 400 mg/kg: $62,7 \pm 6,0\%$) ($P < 0,05$) (Figura 7B) e a exsudação (EBH: 200 mg/kg: $19,8 \pm 6,6\%$ e 400 mg/kg: $24,9 \pm 6,0\%$) ($P < 0,05$) (Figura 7C).

A fração Hex (10-50 mg/kg) inibiu a migração leucocitária (10 mg/kg: $12,7 \pm 4,6\%$, 25 mg/kg: $27,6 \pm 8,5\%$ e 50 mg/kg: $32,7 \pm 6,5\%$) ($P < 0,05$) (Figura 8A) e de neutrófilos (10 mg/kg: $30,6 \pm 3,6\%$, 25 mg/kg: $41,1 \pm 6,8\%$ e 50 mg/kg: $52,5 \pm 2,5\%$) ($P < 0,01$) de forma dose-dependente (Figura 8B).

A fração AcOEt (25 e 50 mg/kg) inibiu a migração de leucócitos nas doses de 25 mg/kg: $45,1 \pm 11,3\%$ e 50 mg/kg: $37,7 \pm 7,7\%$ ($P < 0,01$) (Figura 9A) e de neutrófilos: 25 mg/kg: $53,4 \pm 9,4\%$ e 50 mg/kg: $56,7 \pm 2,8\%$ ($P < 0,01$) (Figura 9B). Contudo as frações Hex e AcOEt não foram efetivas em inibir a exsudação ($P > 0,05$) (Resultados não mostrados).

A fração Alc (10-50 mg/kg) inibiu os leucócitos: 10 mg/kg: $26,1 \pm 4,2\%$, 25 mg/kg: $21,0 \pm 8,8\%$ e 50 mg/kg: $22,3 \pm 1,6\%$ ($P < 0,05$) (Figura 10A), os neutrófilos: 10 mg/kg: $29,9 \pm 5,9\%$, 25 mg/kg: $31,0 \pm 4,9\%$ e 50 mg/kg: $32,9 \pm 0,6\%$ ($P < 0,05$) (Figura 10B) e a exsudação (10 mg/kg: $22,0 \pm 12,1\%$; 25 mg/kg: $31,6 \pm 3,9\%$; 50 mg/kg: $39,4 \pm 5,4\%$) ($P < 0,05$) (Figura 10C).

A subfração Pol (10 mg/kg) reduziu os leucócitos em $21,8 \pm 6,7\%$ ($P < 0,05$) (Figura 11A) e os neutrófilos em $33,7 \pm 5,6\%$ ($P < 0,05$) (Figura 11B). Ainda, esta subfração inibiu a exsudação nas doses de 5 mg/kg ($17,7 \pm 4,3\%$) e 10 mg/kg ($19,6 \pm 6,2\%$) ($P < 0,05$) (Figura 11C).

Já a subfração Apol (1-5 mg/kg), inibiu os leucócitos (1 mg/kg: $21,9 \pm 7,4\%$, 2 mg/kg: $23,0 \pm 5,4\%$ e 5 mg/kg: $29,5 \pm 5,9\%$) ($P < 0,05$) (Figura 12A) e os neutrófilos (1 mg/kg: $30,2 \pm 7,8\%$, 2 mg/kg: $33,9 \pm 3,2\%$ e 5 mg/kg: $38,9 \pm 5,6\%$) ($P < 0,05$) (Figura 12B). Ainda, a subfração Apol, inibiu a exsudação nas doses de 2 mg/kg ($19,0 \pm 4,9\%$) e 5 mg/kg ($16,8 \pm 3,0\%$) ($P < 0,05$) (Figura 12C).

Com relação aos compostos isolados, o DHC (1 e 2 mg/kg)

inibiu a migração de leucócitos (1 mg/kg: $43,5 \pm 7,3\%$ e 2 mg/kg: $22,9 \pm 4,4\%$) ($P < 0,01$) (Figura 13A) e de neutrófilos (1 mg/kg: $49,4 \pm 7,6\%$ e 2 mg/kg: $33,5 \pm 3,2\%$) ($P < 0,01$) (Figura 13B). Além disso, o DHC inibiu a exsudação nas doses de 0,5 mg/kg ($15,9 \pm 3,8\%$), 1 mg/kg ($16,0 \pm 4,0\%$) e 2 mg/kg ($26,2 \pm 3,4\%$) ($P < 0,05$) (Figura 13C).

O β -Sit (1 e 2 mg/kg) foi efetivo em inibir a migração leucocitária (1 mg/kg: $33,0 \pm 9,3\%$ e 2 mg/kg: $26,8 \pm 6,7\%$) ($P < 0,01$) (Figura 14A) e a migração de neutrófilos (1 mg/kg: $49,4 \pm 1,6$ e 2 mg/kg: $50,4 \pm 4,5\%$) ($P < 0,01$) (Figura 14B). Contudo, β -Sit não foi efetivo em inibir a exsudação ($P > 0,05$) (Resultados não mostrados).

Como esperado, a indometacina e a dexametasona inibiram todos os parâmetros inflamatórios estudados ($P < 0,01$) (Figuras 7 a 14).

Após o estudo curva dose e tempo-resposta, verificou-se que EBH (200 mg/kg), Hex (10 mg/kg), AcOEt (25 mg/kg), Alc (10 mg/kg), Pol (10 mg/kg), Apol (1 mg/kg), DHC (1 mg/kg) e β -Sit (1 mg/kg) da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. inibiram a inflamação quando administrados somente 0,5 h antes da indução da inflamação pela Cg. Desta forma, estas doses e tempos de tratamento prévio foram utilizadas para avaliar o efeito da planta sobre outros parâmetros da inflamação descritos a seguir.

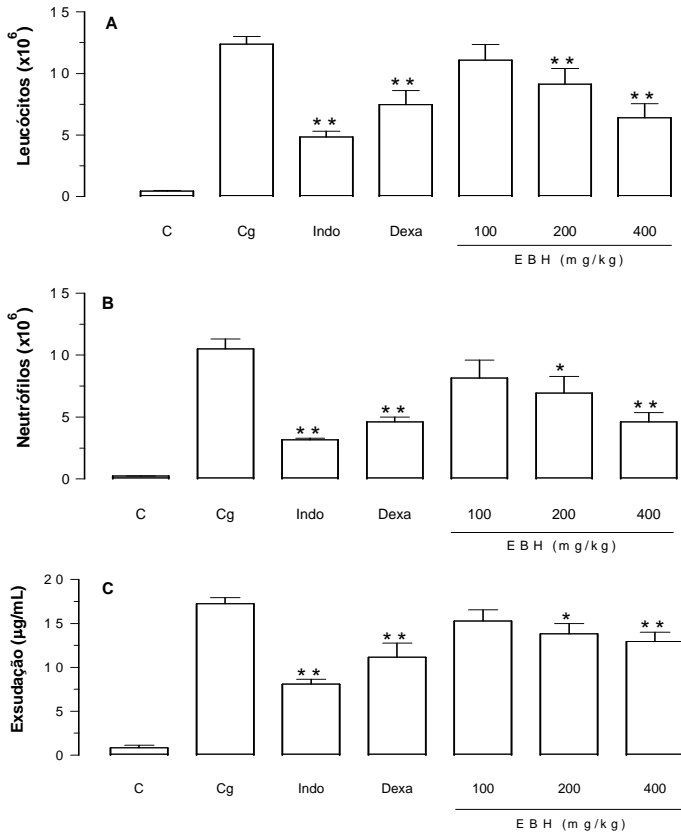


Figura 7: Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (100-400 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos. Efeito do EBH sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. C = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,95%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student), $n = 5$ animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

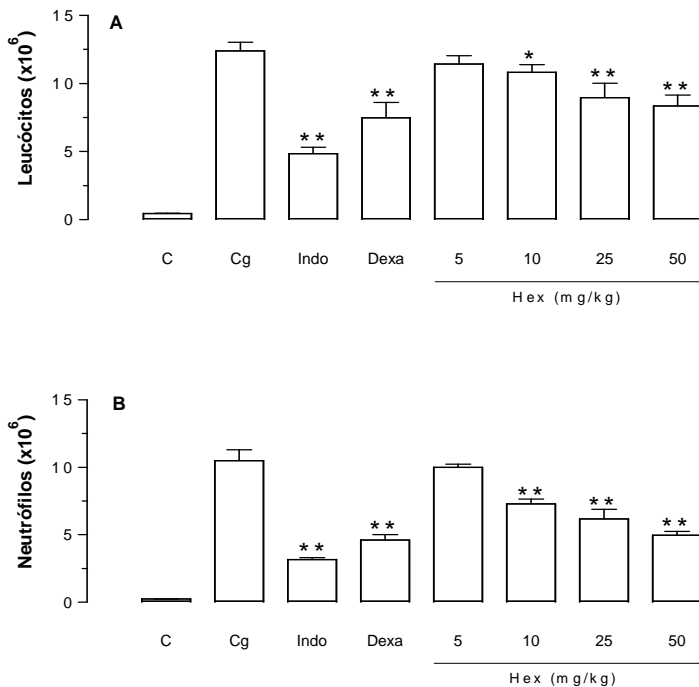


Figura 8: Efeito da fração n-hexano (Hex) (5-50 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos. Efeito da Hex sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos. C = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,95%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student), n = 5 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

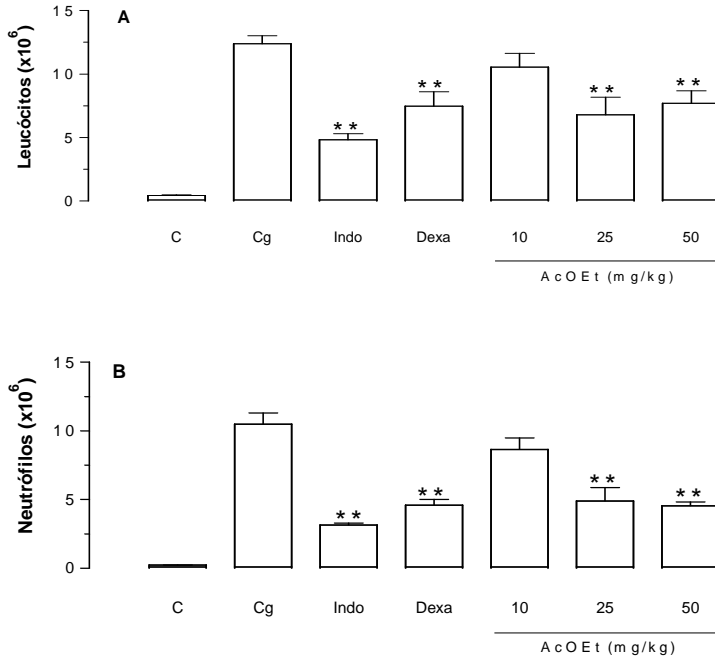


Figura 9: Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) (10-50 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos Efeito da AcOEt sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos. C = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,95%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student), $n = 5$ animais. ** $P < 0,01$.

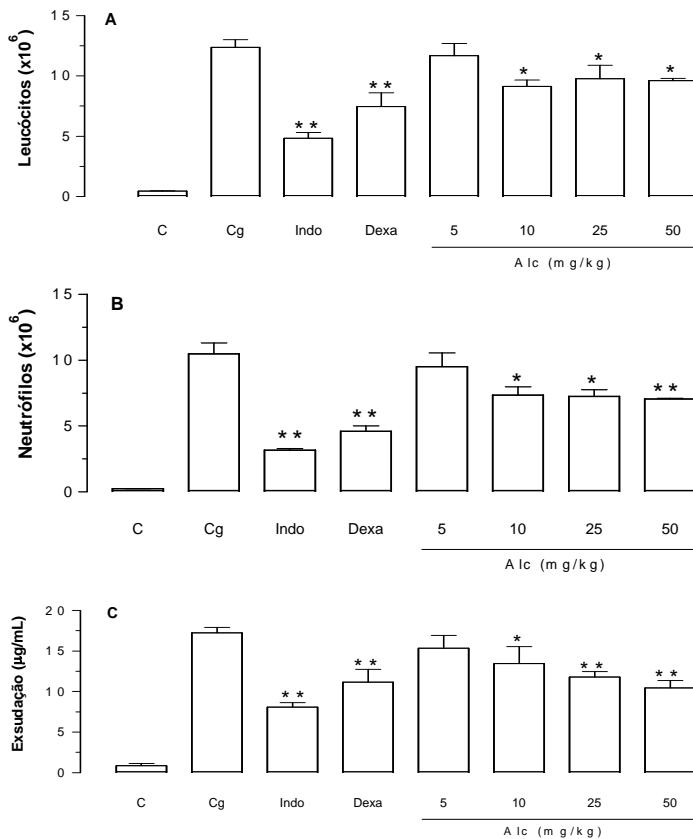


Figura 10: Efeito da fração alcaide (Alc) (5-50 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos Efeito da Alc sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. C = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,95%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student), $n = 5$ animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

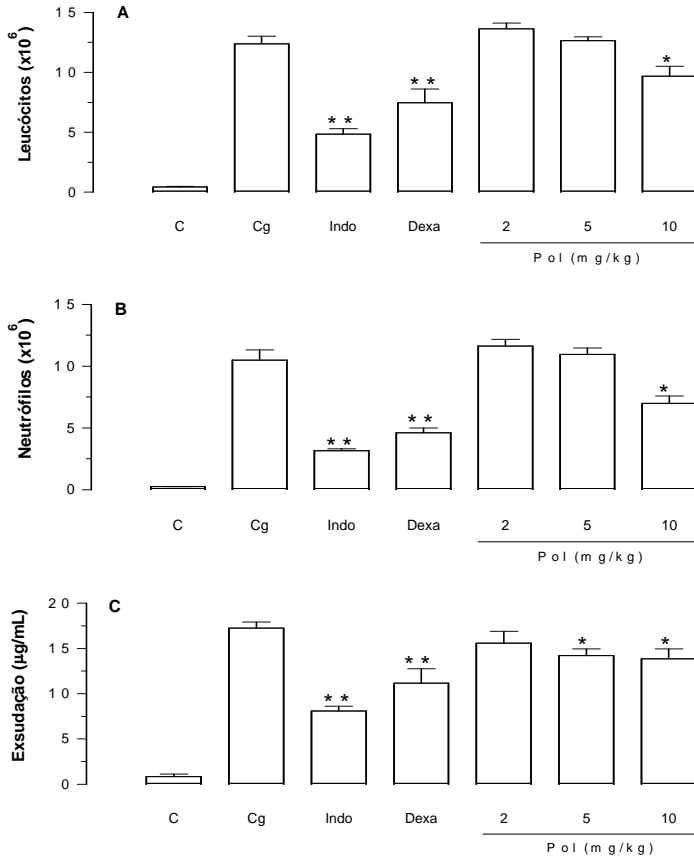


Figura 11: Efeito da subfração polar (Pol) (2-10 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos Efeito da Pol sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. C = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,95%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student), n = 5 animais. * P < 0,05, ** P < 0,01.

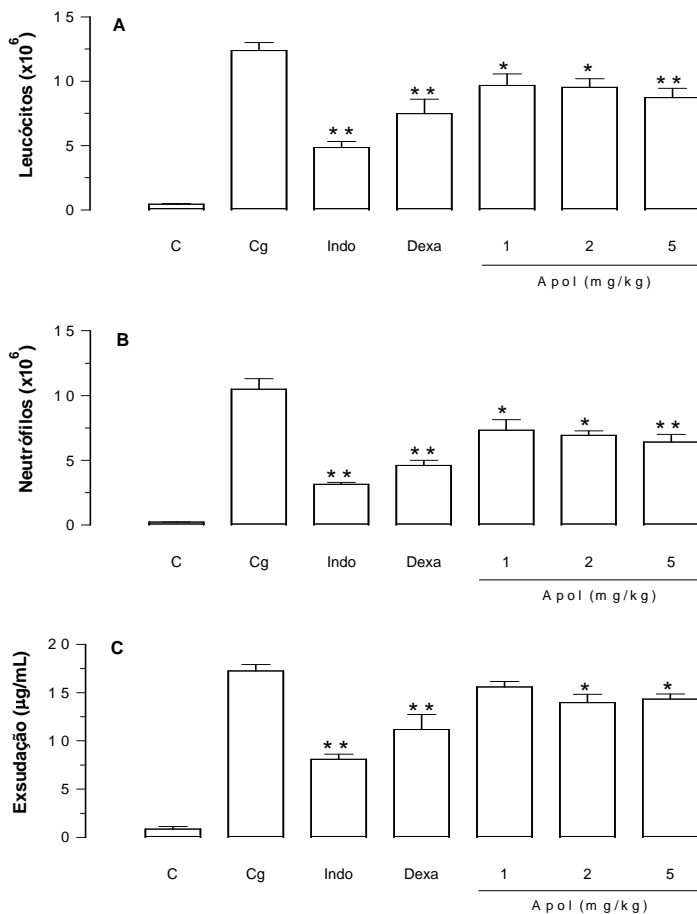


Figura 12: Efeito da subfração apolar (Apol) (1-5 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos. Efeito da Apol sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. C = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,95%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student), $n = 5$ animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

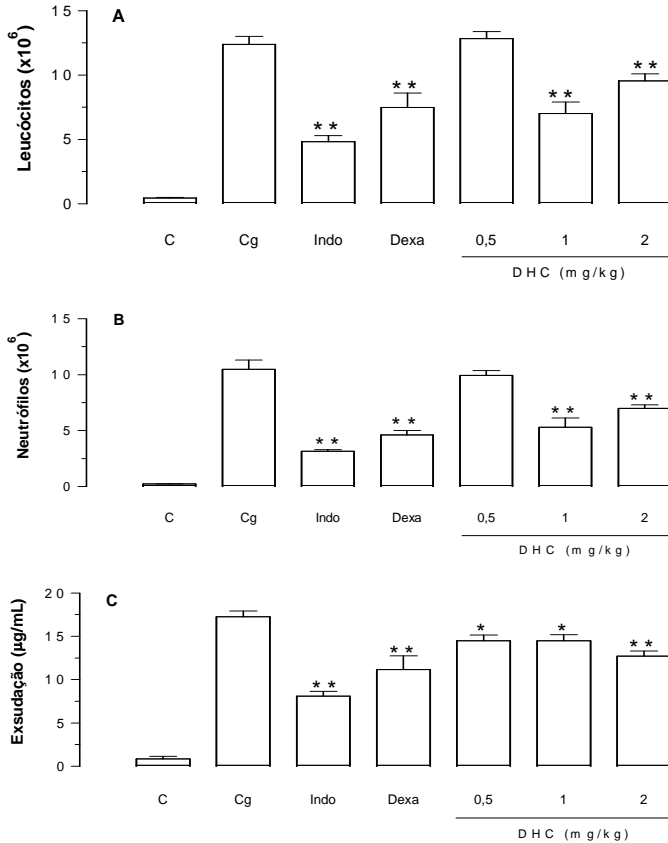


Figura 13: Efeito do composto 1: di-hidrocorinanteol (DHC) (0,5-2 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos. Efeito do DHC sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos, C) Exsudação. C = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,95%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student), $n = 5$ animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

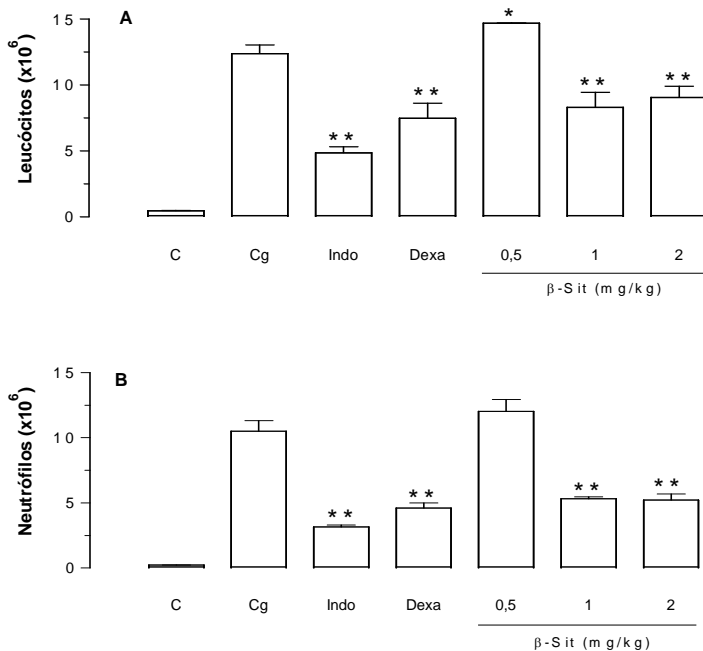


Figura 14: Efeito do composto 2: beta-sitosterol (β -Sit) (0,5-2 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%/cav.) no modelo da bolsa de ar, em camundongos. Efeito do β -Sit sobre: A) Leucócitos, B) Neutrófilos. C = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,95%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.; 0,5 h), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e teste *t* de Student), $n = 5$ animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

3.3.4. Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre as concentrações da MPO

O tratamento prévio dos animais com EBH (200 mg/kg) e suas frações Hex (10 mg/kg), AcOEt (25 mg/kg) e Alc (10 mg/kg), assim como as subfrações Pol (10 mg/kg) ou Apol (1 mg/kg) ou ainda os compostos isolados DHC (1 mg/kg) ou β -Sit (2 mg/kg) inibiram as concentrações da enzima MPO (% de inibição: EBH: $47,5 \pm 8,6$, Hex: $38,3 \pm 3,8$, AcOEt: $46,5 \pm 7,8$, Alc: $50,3 \pm 7,4$, Pol: $34,5 \pm 3,0$, Apol: $34,6 \pm 16,3$, DHC: $31,0 \pm 4,6$, β -Sit: $39,5 \pm 14,8$) ($P < 0,05$) (Figura 15). Os fármacos de referência indometacina e dexametasona inibiram as concentrações da MPO ($P < 0,01$) (Figura 15).

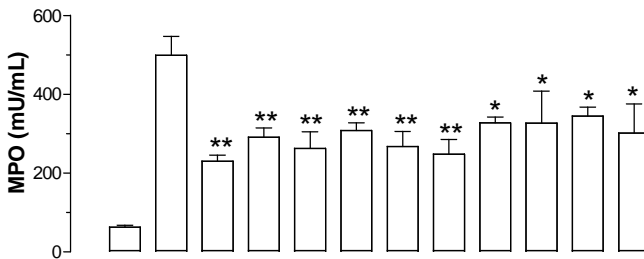


Figura 15: Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 200 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg) ou fração alcaloide (Alc: 10 mg/kg), subfração polar (Pol: 10 mg/kg), subfração apolar (Apol: 1 mg/kg), di-hidrocorinanteol (DHC: 1 mg/kg) ou beta-sitosterol (β -Sit: 2 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e administradas 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) sobre as concentrações da mieloperoxidase (MPO). C = animais tratados apenas com solução salina estéril (NaCl 0,95%). Cg = animais tratados apenas com carragenina (1%/cav). Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e Teste *t* de Student), N = 5 animais. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

3.3.5. Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre as concentrações da ADA

A administração de EBH (200 mg/kg) e suas frações Hex (10 mg/kg), AcOEt (25 mg/kg) e Alc (10 mg/kg), assim como as subfrações Pol (10 mg/kg) ou Apol (1 mg/kg) ou ainda os compostos isolados DHC (2 mg/kg) ou β -Sit (1 mg/kg) inibiram as concentrações da ADA (% de inibição: EBH: $74,8 \pm 4,9$, Hex: $76,9 \pm 8,8$, AcOEt: $64,5 \pm 3,3$, Alc: $54,8 \pm 7,2$, Pol: $60,5 \pm 15,6$, Apol: $71,9 \pm 12,3$, DHC: $23,2 \pm 3,3$, β -Sit: $48,3 \pm 9,5$) ($P < 0,01$) (Figura 16). Tanto indometacina como dexametasona inibiram as concentrações da ADA ($P < 0,01$) (Figura 16).

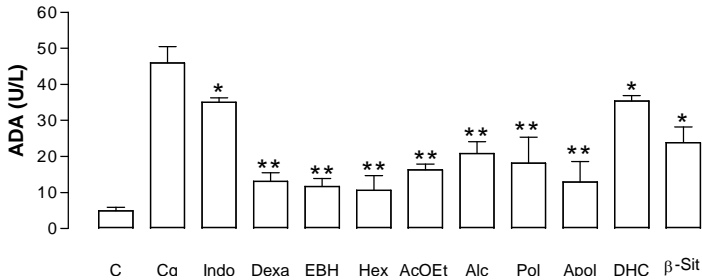


Figura 16: Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 200 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg) ou fração alcaloide (Alc: 10 mg/kg), subfração polar (Pol: 10 mg/kg), subfração apolar (Apol: 1 mg/kg), di-hidrocorinanteol (DHC: 2 mg/kg) ou beta-sitosterol (β -Sit: 1 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e administradas 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) sobre as concentrações da adenosina-desaminase (ADA). C = animais tratados apenas com solução salina estéril (NaCl 0,95%). Cg = animais tratados apenas com carragenina (1%/cav). Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). Dexam = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e Teste t de Student), $N = 5$ animais. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

3.3.6. Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre as concentrações de NO_x

Tanto o EBH (200 mg/kg), como as frações Hex (25 mg/kg), AcOEt (50 mg/kg) e Alc (10 mg/kg), as subfrações Pol (10 mg/kg) ou Apol (1 mg/kg) ou os compostos isolados DHC (1 mg/kg) ou β -Sit (1 mg/kg) inibiram significativamente as concentrações de NO_x (% de inibição: EBH: 56,9 \pm 5,2, Hex: 43,6 \pm 11,2, AcOEt: 40,2 \pm 7,9, Alc: 75,6 \pm 4,2; 40,3 \pm 4,4, Pol: 57,5 \pm 4,9, Apol: 64,6 \pm 9,2, DHC: 60,0 \pm 1,8, β -Sit: 44,1 \pm 7,2) ($P < 0,01$) (Figura 17). Tanto indometacina como dexametasona inibiram as concentrações de NO_x ($P < 0,01$) (Figura 17).

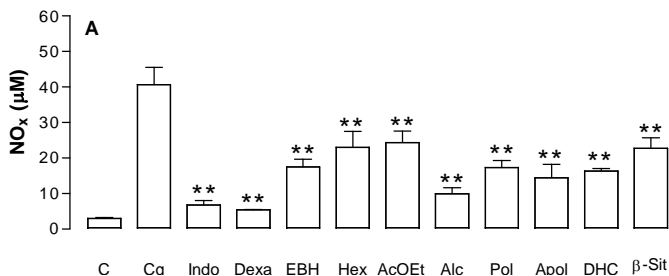


Figura 17: Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 200 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 50 mg/kg) ou fração alcaloide (Alc: 10 mg/kg), subfração polar (Pol: 10 mg/kg), subfração apolar (Apol: 1 mg/kg), di-hidrocorinanteol (DHC: 1 mg/kg) ou beta-sitosterol (β -Sit: 1 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e administradas 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) sobre as concentrações de nitrato/nitrito (NO_x). C = animais tratados apenas com solução salina estéril (NaCl 0,95%). Cg = animais tratados apenas com carragenina (1%/cav). Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e Teste *t* de Student), N = 5 animais. ** $P < 0,01$.

3.3.7. Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a degradação da I κ B- α

Uma vez que o NF- κ B desempenha papel fundamental na síntese de mediadores inflamatórios, como NO, IL-1 β e TNF- α , para elucidar o mecanismo de ação anti-inflamatória do EBH, frações, subfrações e compostos isolados da *Esenbeckia leiocarpa* Engl., foi avaliado o efeito destes sobre a degradação da proteína I κ B- α induzida pela Cg no modelo da bolsa de ar, em camundongos. Tanto o EBH (500 μ g/mL), como as frações Hex (100 μ g/mL), AcOEt (100 μ g/mL), Alk (100 μ g/mL), as subfrações Pol (100 μ g/mL) e Apol (100 μ g/mL), ou o composto β -Sit (50 μ g/mL) não foram efetivos em inibir a degradação de I κ B- α (Figura 18).

No entanto, o composto DHC (50 μ g/mL) foi efetivo em inibir a degradação do I κ B- α no modelo de inflamação estudado (Figura 18).

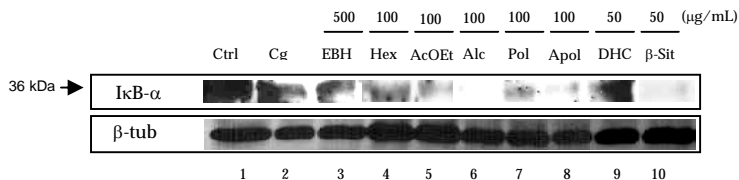


Figura 18: Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a degradação da IκB-α na inflamação induzida pela carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%) (banda 1) ou com Cg (1%/cav) (bandas 2 a 10) e foram mortos após 24 h. A cavidade da bolsa de ar foi lavada com PBS estéril (1,0 mL) (pH 7,4, contendo NaCl (130 mM), Na₂PO₄ (5 mM) e KH₂PO₄ (1 mM) em água destilada contendo heparina (20 UI/mL). Os leucócitos foram coletados e incubados *ex vivo* por 30 min com solução HBSS contendo DMSO a 1% (bandas 1 e 2), extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 500 μg/mL) (banda 3), fração n-hexano (Hex: 100 μg/mL) (banda 4), fração acetato de etila (AcOEt: 100 μg/mL) (banda 5), fração alcaloide (Alc: 100 μg/mL) (banda 6), subfração polar (Pol: 100 μg/mL) (banda 7), subfração apolar (Apol: 100 μg/mL) (banda 8), di-hidrocorinanteol (DHC: 50 μg/mL) (banda 9) ou beta-sitosterol (β-Sit: 50 μg/mL) (banda 10). A degradação de IκB-α foi avaliada 24 h após a indução da inflamação pela carragenina. Acima: IκB-α: Degradação de IκB-α. Abaixo: β-tub: anticorpo anti-beta-tubulina representando o controle positivo das bandas. N = 5 animais.

3.3.8. Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre as concentrações de IL-1β

O EBH (200 mg/kg), suas frações Hex (10 mg/kg), AcOEt (25 mg/kg) ou Alc (10 mg/kg), assim como suas subfrações Pol (10 mg/kg) ou Apol (2 mg/kg), ou ainda os compostos DHC (2 mg/kg) ou β-Sit (1 mg/kg) inibiram as concentrações de IL-1β (% de inibição: EBH: 83,4 ± 0,2, Hex: 54,7 ± 3,1, AcOEt: 28,8 ± 1,4, Alc: 65,8 ± 0,4, Pol: 43,0 ± 3,7, Apol: 52,5 ± 4,0, DHC: 66,3 ± 2,7, β-Sit: 53,1 ± 0,1) ($P < 0,01$) (Figura 19). A indometacina e a dexametasona foram efetivas em inibir as concentrações de IL-1β ($P < 0,01$) (Figura 19).

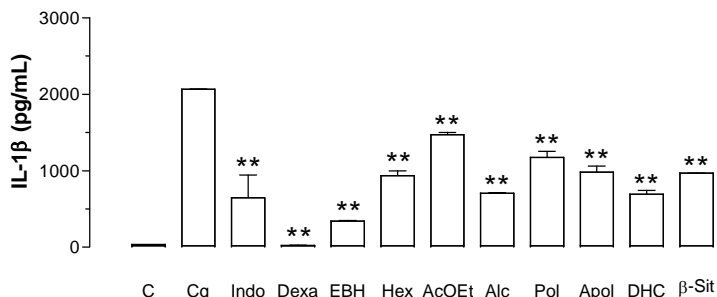


Figura 19: Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 200 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg) ou fração alcaloide (Alc: 10 mg/kg), subfração polar (Pol: 10 mg/kg), subfração apolar (Apol: 2 mg/kg), di-hidrocorinanteol (DHC: 2 mg/kg) ou beta-sitosterol (β -Sit: 1 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e administradas 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) sobre as concentrações de interleucina-1 beta (IL-1 β). C = animais tratados apenas com solução salina estéril (NaCl 0,95%). Cg = animais tratados apenas com carragenina (1%/cav). Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). Dexta = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e Teste *t* de Student), N = 5 animais. ** $P < 0,01$.

3.3.9. Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre as concentrações de TNF- α

Tanto o EBH (200 mg/kg) como suas frações Hex (10 mg/kg), AcOEt (25 mg/kg) ou Alc (10 mg/kg), assim como suas subfrações Pol (10 mg/kg) ou Apol (1 mg/kg), ou ainda os compostos DHC (1 mg/kg) ou β -Sit (1 mg/kg) inibiram as concentrações de TNF- α (% de inibição: EBH: $90,8 \pm 0,1$, Hex: $72,3 \pm 1,2$, AcOEt: $67,9 \pm 1,8$, Alc: $85,3 \pm 0,5$, Pol: $91,4 \pm 0,1$, Apol: $48,2 \pm 2,6$, DHC: $64,4 \pm 1,5$, β -Sit: $54,5 \pm 1,2$) ($P < 0,01$) (Figura 20). Novamente, os fármacos de referência inibiram as concentrações desta citocina pró-inflamatória ($P < 0,01$) (Figura 20).

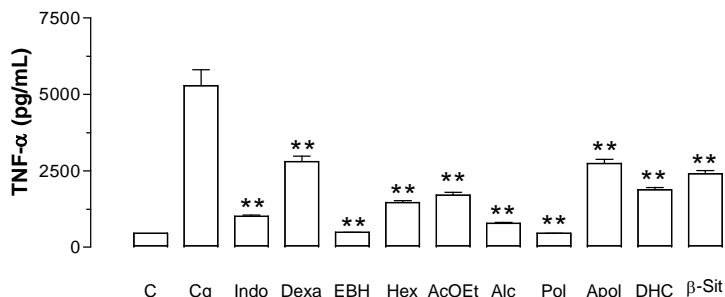


Figura 20: Efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH: 200 mg/kg), fração n-hexano (Hex: 10 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg) ou fração alcaloide (Alc: 10 mg/kg), subfração polar (Pol: 10 mg/kg), subfração apolar (Apol: 1 mg/kg), di-hidrocorinanteol (DHC: 1 mg/kg) ou beta-sitosterol (β -Sit: 1 mg/kg) isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e administradas 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) sobre as concentrações de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). C = animais tratados apenas com solução salina estéril (NaCl 0,95%). Cg = animais tratados apenas com carragenina (1%/cav). Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas (Newman-Keuls e Teste t de Student), N = 5 animais. ** $P < 0,01$.

Após a avaliação dos resultados *in vivo*, observou-se que tanto o EBH, como a fração Alc e o composto DHC apresentaram efeito anti-inflamatório mais significativo nos experimentos *in vivo*, uma vez que foram efetivos em inibir o maior número de parâmetros inflamatórios, em uma dose menor. Além disso, foi observado que o composto DHC foi o composto majoritário para a *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Figura 6). Desta forma, o EBH, a fração Alc e o composto DHC foram escolhidos para a realização dos ensaios *in vitro*.

4. ESTUDOS *IN VITRO*

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar a atividade exercida pelo material vegetal sobre a apoptose de neutrófilos humanos;
- II. Investigar o efeito do material vegetal sobre a fagocitose exercida por neutrófilos humanos;
- III. Verificar o efeito promovido pelo material vegetal na adesão de neutrófilos a células da linhagem A549;
- IV. Avaliar o efeito do material vegetal sobre a degranulação das vesículas secretórias, grânulos específicos/de gelatinase e/ou grânulos azurófilos de neutrófilos humanos;
- V. Analisar a atividade do material vegetal sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos meios intra e extracelular de neutrófilos humanos;
- VI. Avaliar o efeito do material vegetal sobre a produção de citocinas e/ou quimiocinas por neutrófilos humanos;
- VII. Estudar o efeito do composto beta-sitosterol sobre a captação de Ca^{2+} em neutrófilos murinos ativados.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal

O material vegetal foi isolado conforme descrito anteriormente (págs. 44 - 46, item 3.2. - Materiais e Métodos). Para os estudos *in vitro*, foram avaliados o EBH, a fração Alc e o composto DHC, uma vez que, além do EBH, a fração Alc demonstrou possuir a melhor atividade anti-inflamatória dentre as frações e subfrações avaliadas, e o composto DHC foi o composto majoritário para a *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Além disso, foi avaliado o efeito do composto β -Sit sobre a captação de cálcio (Ca^{2+}) em neutrófilos murinos ativados, uma vez que este composto pareceu também ser um dos responsáveis pelo efeito inibitório promovido pelo material vegetal *in vivo*.

4.2.2. Isolamento de neutrófilos humanos

Os neutrófilos foram isolados do sangue venoso de doadores voluntários saudáveis, que apresentavam idade igual ou superior a 18 anos e que concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos do INRS-Instituto Armand-Frappier, Universidade de Quebec (LAVASTRE et al., 2002).

A viabilidade celular foi avaliada por coloração com azul de trypan. Os neutrófilos viáveis foram centrifugados e corados com auxílio do kit de coloração Hema 3 (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ, E.U.A.).

4.2.3. Avaliação da citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade *in vitro* promovida pela *Esenbeckia leiocarpa* Engl., foi avaliado o efeito do EBH em neutrófilos humanos. Para isto, estas células foram isoladas e incubadas *in vitro* com HBSS (pH 7,4) (controle – Ctrl) ou com EBH (1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por diferentes períodos de tempo (0-24 h) e

a necrose celular foi avaliada pela exclusão de azul de trypan conforme descrito por Girard e colaboradores (1996).

4.2.4. Determinação da apoptose celular

Para avaliação da apoptose de neutrófilos humanos, estes foram isolados e incubados (10×10^6 céls/mL) com HBSS (pH 7,4) (controle de apoptose espontânea - AE), ou com diferentes concentrações do EBH, fração Alc ou composto DHC (1-500 $\mu\text{g/mL}$) em meio RPMI 1640-HEPES-penicilina/estreptomicina suplementado com 10% de soro autólogo inativado. As células foram então centrifugadas, coradas (Hema 3 - Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ, E.U.A.), e a leitura realizada em microscópio óptico (Leica Microsystems, Richmond Hill, Canadá) em aumento de 400 x. Os neutrófilos apoptóticos foram definidos como células contendo um ou mais núcleos picnóticos característicos. Os resultados foram expressos como porcentagem de células apoptóticas e os grupos tratados foram comparados com o grupo AE (GIRARD et al., 1996).

Para a avaliação do mecanismo de indução da apoptose, neutrófilos humanos (10×10^6 céls/mL) foram incubadas com HBSS (pH 7,4) ou com EBH (500 $\mu\text{g/mL}$), Alc (100 $\mu\text{g/mL}$) ou DHC (50 $\mu\text{g/mL}$), na presença ou ausência dos seguintes agonistas e/ou inibidores: catalase (CAT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, E.U.A.), inibidor da p38 MAPK SB203580 (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, E.U.A.), inibidor das caspases 1, 3, 4 e 7, N-ben-ziloxicarbonil-V-A-D-O-metilfluorometilcetona (z-VAD-FMK) (Calbiochem, La Jolla, CA, E.U.A.), inibidor da caspase 3 z-Asp(OMe)-Gln-Met-Asp(OMe)-FMK (z-DQMD-FMK) (Calbiochem, La Jolla, CA, E.U.A.), inibidor irreversível da caspase 6 z-Val-Glu(OMe)-Ile-Asp(OMe)-FMK (z-VEID-FMK) (Calbiochem, La Jolla, CA, E.U.A.), inibidor irreversível da caspase 9 z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-FMK (z-LEHD-FMK) (Calbiochem, La Jolla, CA, E.U.A.) ou trióxido de arsênio (As_2O_3) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, E.U.A.), um agente indutor da apoptose, conforme descrito previamente (BINET; GIRARD, 2008). Novamente, os resultados foram expressos

como porcentagem de células apoptóticas e os grupos tratados foram comparados com o grupo AE (GIRARD et al., 1996).

4.2.5. Determinação da fagocitose por neutrófilos

Para a avaliação da fagocitose pelos neutrófilos, eritrócitos de carneiro (20×10^6 céls/mL) foram opsonizados com anticorpos de coelho do tipo IgG anti-eritrócitos de carneiro por meio de incubação sob agitação constante em estufa a 37°C por 15 min (ENNACIRI; GIRARD, 2009). Os neutrófilos humanos isolados (4×10^6 céls/mL) foram mantidos em meio RPMI 1640 e incubados com o diluente (DMSO a 1% em HBSS) (controle negativo) (Ctrl), fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (65 ng/mL), EBH (500 $\mu\text{g/mL}$), fração Alc (100 $\mu\text{g/mL}$), ou DHC (50 $\mu\text{g/mL}$) por 30 min. A seguir, os neutrófilos foram incubados com os eritrócitos de carneiro opsonizados por 45 min. As amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes descartados. Os eritrócitos de carneiro não fagocitados foram lisados por lavagens consecutivas com água destilada, seguidas por adição de tampão PBS gelado. As amostras foram lavadas com PBS gelado e o pellet final foi ressuspensionado. As células foram centrifugadas e coradas com Hema 3 (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ, USA). A fagocitose foi quantificada em microscópio óptico comum (Leica Microsystems, Richmond Hill, Canadá). Os resultados foram expressos em porcentagem de neutrófilos capazes de fagocitar um ou mais eritrócitos de carneiro opsonizado (ENNACIRI; GIRARD, 2009).

4.2.6. Determinação da adesão de neutrófilos

A avaliação da adesão dos neutrófilos humanos foi avaliada conforme descrito por Pelletier e Girard (2005). Para isto, verificou-se a adesão dos mesmos a células de adenocarcinoma de laringe humano da linhagem A549 (ATCC), mantidas em meio RPMI 1640-HEPES-penicilina/estreptomicina na presença de soro fetal bovino. As mesmas foram dispostas em

lamínulas de vidro e lavadas duas vezes com HBSS (pH 7,4). Os neutrófilos (10×10^6 céls/mL) foram isolados e incubados com o diluente (DMSO a 1% em HBSS) (controle negativo) (Ctrl), TNF- α (10 ng/mL), EBH (500 μ g/mL), Alc (100 μ g/mL), ou DHC (50 μ g/mL) em estufa a 37°C por 30 min. Os neutrófilos foram então incubados com calceína-AM (5 μ M) a temperatura ambiente por 30 min no escuro, para marcação das células viáveis. Uma suspensão de neutrófilos foi obtida e alíquotas de 500 μ L foram adicionadas a uma microplaca de 12 poços. As lamínulas contendo as células A549 foram dispostas de maneira confluyente sobre os poços e deixadas em repouso. As lamínulas foram então lavadas e dispostas sobre lâminas para posterior leitura da adesão neutrofílica em microscópio de fluorescência (Leica Microsystems, Richmond Hill, Canadá). Para esta leitura, foram contados ao menos 5 campos aleatórios. Os resultados foram expressos como índice de adesão, que foi determinado pela razão do valor absoluto de células fluorescentes na amostra pelo valor absoluto do grupo Ctrl.

4.2.7. Avaliação da degranulação de neutrófilos

Para avaliação da degranulação dos diferentes grânulos de neutrófilos, foi monitorada a expressão de CD35 (vesículas secretórias), CD66b (grânulos secundários/específicos e/ou terciários/de gelatinase) e CD63 (grânulos primários/azurófilos) por citometria de fluxo, conforme metodologia previamente descrita (JOG et al., 2007). Para bloqueio de ligações não-específicas dos anticorpos, as células foram incubadas por 30 min em banho de gelo com 20% de soro autólogo, previamente inativado (56°C por 30 min). A seguir, foram realizadas 3 lavagens com PBS e o anticorpo primário ou um controle isotípico IgG1 foram adicionados na concentração de 1 μ g/mL em HBSS por 30 min em banho de gelo. As células foram então lavadas 2 vezes em HBSS e incubadas com 1 μ g/mL de anticorpo de cabra anti-camundongo conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 30 min em banho de gelo. Após esta etapa, foram realizadas mais 3 lavagens, e as células foram

ressuspendidas em HBSS e a leitura realizada em um FACScan (Biosciences, San Jose, CA, E.U.A.). Os resultados foram expressos como média da intensidade de fluorescência (JOG et al., 2007).

4.2.8. Determinação das concentrações intracelulares e extracelulares de espécies reativas de oxigênio

Primeiramente, para determinar as concentrações intracelulares de EROs, os neutrófilos (1×10^6 céls/mL) foram incubados por 3 h com HBSS (pH 7,4), EBH (500 $\mu\text{g/mL}$), Alc (100 $\mu\text{g/mL}$), ou DHC (50 $\mu\text{g/mL}$), na presença ou na ausência do agonista forbol-12-mirostato-13-acetato (PMA) (10^{-7} M). As concentrações intracelulares de EROs foram detectadas com o auxílio da sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato ($\text{H}_2\text{DC-FDA}$), sonda esta permeável e não fluorescente, como descrito por Miyajima e colaboradores (1997). Após a estimulação, as células foram lavadas com HBSS e marcadas com $\text{H}_2\text{DC-FDA}$ (5 $\mu\text{g/mL}$) em estufa a 37°C por 15 min. A H_2 -diclorofluoresceína é rapidamente oxidada pelas EROs à diclorofluoresceína, emitindo fluorescência. Como grupo controle positivo, a intensidade de fluorescência nos neutrófilos foi mensurada na presença de H_2O_2 (30 μM).

A quantificação das concentrações extracelulares de EROs, foi representada pela determinação das concentrações extracelulares do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), realizada por método colorimétrico, pela redução do ferrocitocromo *c*, conforme descrito por Herndon e colaboradores (2003). Neutrófilos humanos (1×10^6 céls/mL) foram isolados e mantidos em tampão HBSS suplementado com cloreto de cálcio (CaCl_2) (1,6 mM) na presença ou na ausência da enzima superóxido dismutase (SOD) (10 $\mu\text{g/mL}$). Estas células foram então incubadas simultaneamente com HBSS (7,4), EBH (500 $\mu\text{g/mL}$), Alc (100 $\mu\text{g/mL}$) ou DHC (50 $\mu\text{g/mL}$), e com ferrocitocromo *c* (150 μM) (Sigma-Aldrich) em estufa a 37°C por 5 min, na presença ou na ausência de PMA (10^{-7} M). A absorvância foi mensurada a 550 nm. Os resultados foram expressos como

concentração de O_2^- (nmol) por 10^6 células, utilizando um coeficiente de extinção molar de 21,1 (HERNDON et al., 2003).

4.2.9. Produção de citocinas/quimiocinas por neutrófilos

Para a quantificação das citocinas/quimiocinas sintetizadas e liberadas pelos neutrófilos humanos, foram utilizadas membranas contendo um conjunto de anticorpos específicos contra um painel contendo 36 citocinas/quimiocinas humanas: fator do sistema complemento C5a (C5a), CD40 ligante (CD40L), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), oncogene-alfa relacionado ao crescimento (GRO- α), proteína quimiotática para monócitos 1-309 (1-309), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), interferon- γ (IFN- γ), interleucina-1 alfa (IL-1 α), interleucina-1 beta (IL-1 β), antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1ra), interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12p70 (IL-12p70), interleucina-13 (IL-13), interleucina-16 (IL-16), interleucina-17 (IL-17), interleucina-17E (IL-17E), interleucina-23 (IL-23), interleucina-27 (IL-27), interleucina-32 alfa (IL-32 α), proteína-10 induzida por interferon-gama (IP-10/CXCL10), quimiotático-alfa de células T induzível por interferon (I-TAC/CXCL11), proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1/CCL2), fator inibitório de migração de macrófagos (MIF), proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa (MIP-1 α /CCL3), proteína inflamatória de macrófagos-1 beta (MIP-1 β /CCL4), serpina E1 ou inibidor do ativador do plasminogênio (Serpina E1/PAI-1), quimiocina RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted*) (RANTES/CCL5), fator derivado de célula estromal-1 (SDF-1), TNF- α e receptor de desencadeamento expresso em células mieloides-1 (TREM-1), (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, E.U.A.). As reações de detecção foram realizadas simultaneamente para todos os analitos testados, duas semanas após a coleta e o isolamento das células, conforme instruções do

fabricante. Estudos prévios realizados no Laboratório de Pesquisa em Inflamação e Fisiologia de Granulócitos, Instituto Armand-Frappier-INRS, Laval, Canadá, utilizando neutrófilos isolados de dois doadores de sangue saudáveis estimulados com LPS demonstraram que os resultados são reproduzíveis (dados não mostrados). Desta forma, foi obtido um *pool* dos sobrenadantes dos neutrófilos isolados ($n = 3$ experimentos diferentes) e estas células foram tratadas com HBSS (controle – Ctrl), LPS (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (controle positivo), EBH (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Alc (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou DHC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ou ainda EBH + LPS, Alc + LPS ou DHC + LPS. A emissão de quimiluminescência relativa a cada analito foi detectada pelo revelador Kodak X OMAT-RA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.). A intensidade do sinal quimiluminescente de cada analito (em duplicata) foi corrigida por comparação com os controles positivos internos de cada membrana. Os resultados foram expressos como valores integrados de densidade (IDV). As membranas foram então escaneadas e foi realizada uma análise densitométrica, com auxílio do programa Multi-Analyst (Bio-Rad, Hercules, CA, E.U.A.).

4.2.10. Efeito do beta-sitosterol sobre a captação de cálcio por neutrófilos ativados

Neutrófilos murinos ativados (10^6 céls/tubo) foram coletados da cavidade da bolsa de ar de camundongos previamente tratados com Cg por 24 h. Estas células foram incubadas previamente em tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb) (122 mM de NaCl; 3 mM de KCl; 1,2 mM de MgSO_4 ; 1,3 mM de CaCl_2 ; 0,4 mM de KH_2PO_4 ; 25 mM de NaHCO_3) (pH 7,4) em um incubador metabólico Dubnoff a 37°C por 15 min em uma atmosfera de $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5; v/v). Após esta etapa, as células foram centrifugadas ($1.000 \times g$) por 2 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão KRb fresco, contendo 0,1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ pelos períodos de 15, 30, 45 e 60 min para determinação do equilíbrio de cálcio. Para a quantificação da captação de Ca^{2+} , foi avaliada uma curva tempo-

resposta, em que os neutrófilos foram incubados por 1, 5 e 15 min, na ausência (controle) ou na presença do composto beta-sitosterol (β -Sit) (10^{-7} M). Após a obtenção do melhor tempo de indução da captação de Ca^{2+} (1 min), foi verificada a curva dose-resposta, na qual as células foram incubadas por 1 min com diferentes concentrações de β -Sit (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M).

Em determinados experimentos, a nifedipina (1 μM), um bloqueador de canais de Ca^{2+} voltagem-dependente do tipo L, o BAPTA-AM (50 μM), um quelante de Ca^{2+} intracelular, a colchicina (1 μM), um desestabilizador da rede de microtúbulos, ou o composto LY294002 (10 μM), um inibidor da enzima fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) foram incubados 15 min antes da estimulação das células com β -Sit (ZAMONER et al., 2005, 2007, 2008; MENEGAZ et al., 2010a, b; BOURAÏMA-LELONG et al., 2010).

Para a determinação das concentrações extracelulares de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nos neutrófilos, estas células foram lavadas com NaCl (127,5 mM), KCl (4,6 mM), MgSO_4 (1,2 mM), HEPES (10 mM), glicose (11 mM) e LaCl_3 (10 mM) (pH 7,4) por 30 min. As células foram então homogeneizadas com NaOH (0,5 M) e alíquotas de 100 μL foram adicionadas ao líquido de cintilação. A leitura foi realizada em um espectrômetro de cintilação LKB rack beta modelo LS 6500 (Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman, Boston, MA, E.U.A.) (HUNG; YEN, 2001; ZAMONER et al., 2008; MENEGAZ et al., 2010a). Finalmente, alíquotas de 50 μL foram utilizadas para a quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Os resultados foram expressos como pmol de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por μg de proteínas (ZAMONER et al., 2005, 2007, 2008; MENEGAZ et al., 2010a).

4.2.11. Fármacos e reagentes

Para a realização dos estudos *in vitro*, foram utilizados os reagentes descritos a seguir: dimetilsulfóxido (DMSO), forbol-12-mirostato-13-acetato (PMA), fator de necrose tumoral-alfa

(TNF- α), n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e lipopolissacarídeo (LPS) foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.). Ainda, fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (Pepro Tech Inc., Rocky Hill, NJ, E.U.A.), anticorpo monoclonal anti-CD35 (clone E11) e anti-CD63 (clone H5C6) (BD PharMingen, São Diego, CA, E.U.A.), anticorpo monoclonal anti-CD66b (clone 80H3) (AbDSerotec, Raleigh, NC, E.U.A.), inibidor das caspases 1, 3, 4 e 7, N-ben-ziloxicarbonil-V-A-D-O-metilfluorometilcetona (z-VAD-FMK) (Calbiochem, La Jolla, CA, E.U.A.), inibidor da caspase 3 z-Asp(OMe)-Gln-Met-Asp(OMe)-FMK (z-DQMD-FMK) (Calbiochem, La Jolla, CA, E.U.A.), inibidor irreversível da caspase 6 z-Val-Glu(OMe)-Ile-Asp(OMe)-FMK (z-VEID-FMK) (Calbiochem, La Jolla, CA, E.U.A.), inibidor irreversível da caspase 9 z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-FMK (z-LEHD-FMK) (Calbiochem, La Jolla, CA, E.U.A.), trióxido de arsênio (As₂O₃), nifedipina, 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetra-acético tetrakis (acetoximetil éster) (BAPTA-AM), colchicina e LY294002 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, E.U.A.), [⁴⁵Ca]CaCl₂ (sp. act. 321 KBq/mg Ca²⁺) e líquido de cintilação biodegradável Optiphase Hisafe III (PerkinElmer, Boston, MA, E.U.A.). Outros sais e reagentes, de grau de pureza analítica, foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

4.2.12. Análise estatística

As diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e tratados com o material vegetal foram realizados por meio de análise de variância ANOVA (teste paramétrico) bicaudal. Quando necessário utilizou-se o teste *t* de Student (não-pareado). Para as análises densitométricas, utilizou-se o programa Fluor S MultiImager, Quantity One[®], versão 4.6.6 (Bio-Rad, Hercules, CA, E.U.A.). Ainda, os dados relativos à captação de cálcio foram expressos como pmol de ⁴⁵Ca²⁺/μg de proteína ou como porcentagem do controle. Para estas análises, diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo teste Kruskal-Walles, seguido por teste post hoc (teste de Dunn).

Para todas as análises estatísticas, valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Avaliação da citotoxicidade da *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

O EBH (1-500 $\mu\text{g/mL}$), a fração Alc (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e o composto DHC (10 e 50 $\mu\text{g/mL}$) promoveram necrose celular em menos de 3% dos neutrófilos quando incubados por 24 h (resultados não mostrados). Ainda, a necrose celular foi inferior a 5% quando as células foram incubadas com EBH (1000 $\mu\text{g/mL}$), Alc (500 $\mu\text{g/mL}$) ou DHC (100 $\mu\text{g/mL}$) (por períodos de tempo curtos (< 1 h). Finalmente, para as células incubadas por 24 h com EBH (> 1000 $\mu\text{g/mL}$), Alc (> 500 $\mu\text{g/mL}$) ou DHC (> 100 $\mu\text{g/mL}$) a necrose celular foi de até 15% (resultados não mostrados).

4.3.2. Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a apoptose celular

O EBH, nas doses de 500-1000 $\mu\text{g/mL}$, foi efetivo em induzir significativamente a apoptose de neutrófilos humanos (% de células apoptóticas: 500 $\mu\text{g/mL}$: $79,0 \pm 6,0$, 750 $\mu\text{g/mL}$: $92,4 \pm 2,9$, 1000 $\mu\text{g/mL}$: $94,6 \pm 1,5$), quando comparados ao grupo apoptose espontânea (AE: $56,7 \pm 3,7\%$) ($P < 0,01$) (Figura 21A).

Já a fração Alc nas doses de 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ aumentou significativamente a apoptose dos neutrófilos humanos (% de células apoptóticas: 100 $\mu\text{g/mL}$: $72,3 \pm 5,2$ e 500 $\mu\text{g/mL}$: $85,0 \pm 4,0$), quando comparada ao grupo AE ($56,3 \pm 3,3\%$) ($P < 0,05$) (Figura 21B).

Com relação ao composto isolado DHC, o mesmo nas doses de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ induziu significativamente a apoptose de neutrófilos humanos (% de células apoptóticas: 50 $\mu\text{g/mL}$:

74,0 ± 2,6 e 100 µg/mL: 87,3 ± 2,3) quando comparado ao grupo AE (54,0 ± 1,5%) (P < 0,01) (Figura 21C). Desta forma, EBH (500 µg/mL), Alc (100 µg/mL) e DHC (50 µg/mL) foram as concentrações escolhidas para os experimentos *in vitro* subsequentes.

Para a avaliação do mecanismo indutor da apoptose de neutrófilos, primeiramente estudou-se a participação de diferentes caspases neste processo. A indução da apoptose pelo EBH (500 µg/mL), pela fração Alc (100 µg/mL) e pelo composto DHC (50 µg/mL) foi revertida significativamente pela adição do inibidor das caspases 1, 3, 4 e 7 (z-VAD-FMK) (% de células apoptóticas: EBH: 70,0 ± 2,1, Alc: 71,7 ± 2,7 e DHC: 69,7 ± 1,2) (P < 0,05) (Figura 22). Ainda, a indução da apoptose promovida pelo DHC (50 µg/mL), mas não pelo EBH (500 µg/mL) ou pela fração Alc (100 µg/mL), foi revertida significativamente pelos inibidores seletivos para caspase 3 (z-DQMD-FMK) (DHC: 54,3 ± 5,9%), caspase 6 (z-VEID-FMK) (DHC: 39,7 ± 6,1%) ou caspase 9 (z-LEHD-FMK) (DHC: 48,3 ± 4,2%) (P < 0,01) (Figura 22C).

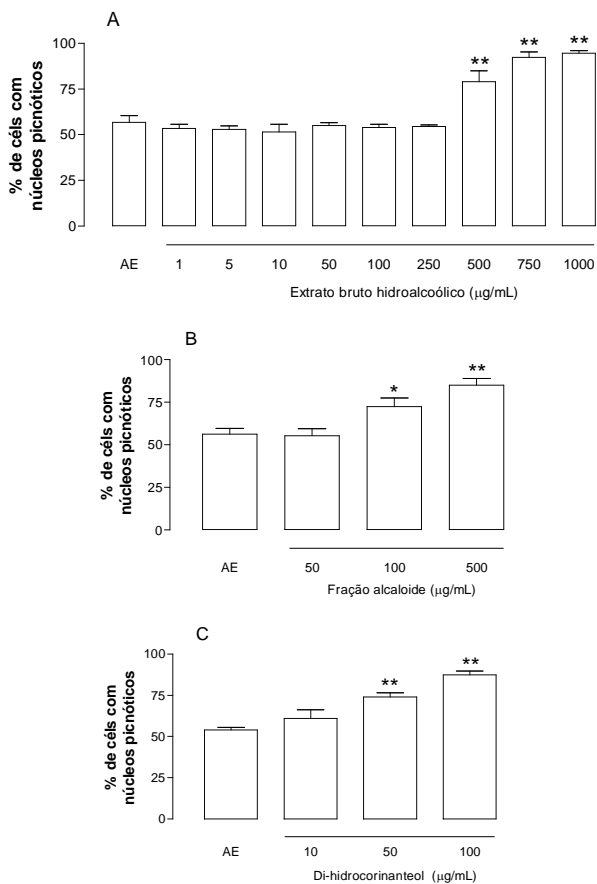


Figura 21: Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a apoptose de neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos (10×10^6 céls/mL) foram isolados e incubados com o diluente (HBSS – DMSO 1%), grupo apoptose espontânea (AE), ou com extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (1-1000 µg/mL) (A), fração alcaloide (Alc) (50-500 µg/mL) (B) ou di-hidrocorinanteol (DHC) (10-100 µg/mL) (C) por 24 h. Células apoptóticas foram determinadas pela presença de núcleos picnóticos, por leitura em microscópio óptico comum. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. ($n \geq 3$). AE = apoptose espontânea (células incubadas apenas com o diluente). *, $P < 0,05$, **, $P < 0,01$ versus AE pelo teste *t* de Student.

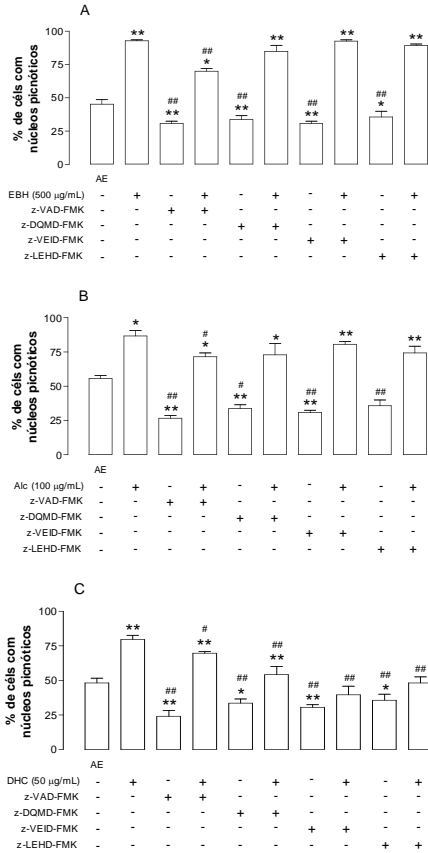


Figura 22: Envolvimento das caspases na apoptose induzida pela *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Neutrófilos (10×10^6 céls/mL) foram incubados com o diluente (HBSS – DMSO 1%), grupo apoptose espontânea (AE), ou com extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (500 µg/mL) (A), fração alcaloide (Alc) (100 µg/mL) (B) ou di-hidrocorinanteol (DHC) (50 µg/mL) (C), na presença (+) ou na ausência (-) dos seguintes inibidores: z-VAD-FMK (caspases 1, 3, 4 e 7), z-DQMD-FMK (caspase 3), z-VEID-FMK (caspase 6), ou z-LEHD-FMK (caspase 9) por 24 h. Células apoptóticas foram determinadas pela presença de núcleos picnóticos, por leitura em microscópio óptico. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. (n = 4). AE = apoptose espontânea (células incubadas apenas com o diluente). *, P < 0,05, **, P < 0,01 versus AE; ###, P < 0,01 versus EBH (A), Alc (B) ou DHC (C) (teste t de Student).

Posteriormente, foi avaliada a participação de espécies reativas de oxigênio no processo de aceleração da apoptose espontânea (AE) induzida pela *Esenbeckia leiocarpa* Engl. em neutrófilos humanos. Como demonstrado na Figura 21, tanto o EBH, como a fração Alc e o composto DHC foram efetivos em induzir a apoptose em relação à AE. Desta forma, foi adicionada a enzima CAT, que degrada o H_2O_2 , inibindo, desta forma, a AE (Figura 23). Com relação à apoptose induzida pelo EBH (500 $\mu\text{g/mL}$), esta foi inibida significativamente pela CAT (EBH: $26,7 \pm 10,8\%$) ($P < 0,01$) (Figura 23A). Da mesma forma, a apoptose induzida pela fração Alc (100 $\mu\text{g/mL}$) foi significativamente revertida pela CAT (Alc: $15,7 \pm 5,3\%$) ($P < 0,01$) (Figura 23B). Ainda, com relação à apoptose induzida pelo composto DHC (50 $\mu\text{g/mL}$), esta também foi revertida significativamente pela CAT (DHC: $17,7 \pm 1,7\%$) ($P < 0,01$) (Figura 23C).

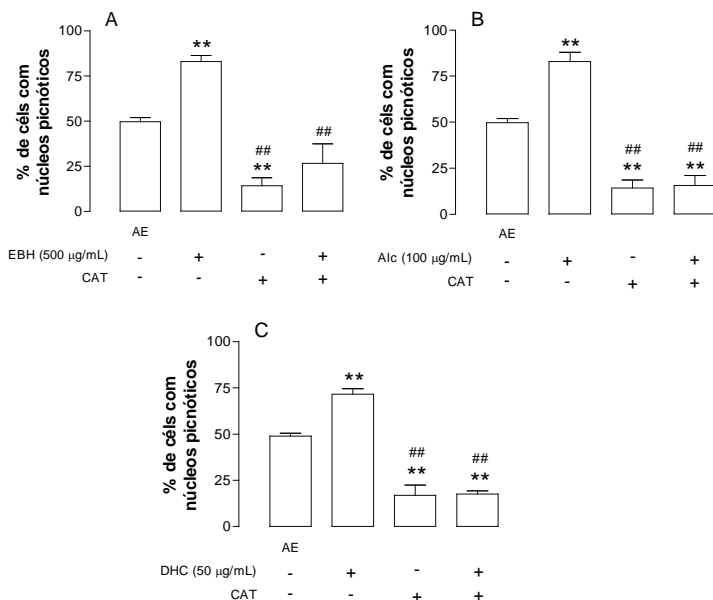


Figura 23: Envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROs) na apoptose induzida pela *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Neutrófilos (10×10^6 céls/mL) foram incubados com o diluente (HBSS – DMSO 1%), grupo apoptose espontânea (AE), ou com extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (500 µg/mL) (A), fração alcaloide (Alc) (100 µg/mL) (B) ou di-hidrocorinanteol (DHC) (50 µg/mL) (C), na presença (+) ou na ausência (-) da enzima catalase (CAT) por 24 h. Células apoptóticas foram determinadas pela presença de núcleos picnóticos, por leitura em microscópio óptico comum. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. ($n = 4$). AE = apoptose espontânea (células incubadas apenas com o diluente). **, $P < 0,01$ versus AE; ##, $P < 0,01$ versus EBH (A), Alc (B) ou DHC (C) (teste t de Student).

4.3.3. Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a fagocitose de neutrófilos

Posteriormente, avaliou-se o efeito do EBH, fração Alc e composto DHC sobre a fagocitose de eritrócitos de carneiro pelos neutrófilos. O EBH (500 $\mu\text{g/mL}$), a fração Alc (100 $\mu\text{g/mL}$) e o composto DHC (50 $\mu\text{g/mL}$) foram efetivos em aumentar significativamente a fagocitose (EBH: $61.7 \pm 3.2\%$ e Alc: $65.3 \pm 8.4\%$) quando comparados ao grupo controle negativo (Ctrl) ($43.0 \pm 5.6\%$) ($P < 0,05$) (Figura 24). Já o composto DHC não alterou significativamente a fagocitose de eritrócitos de carneiro opsonizados exercida pelos neutrófilos ($P > 0,05$) (Figura 24).

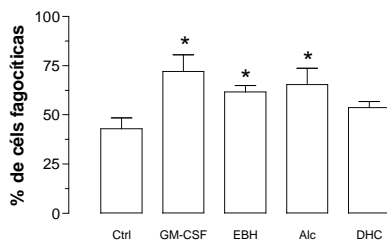


Figura 24: Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a fagocitose exercida pelos neutrófilos. Neutrófilos humanos (4×10^6 céls/mL) foram isolados e previamente incubados por 30 min com o diluente (HBSS – DMSO 1%) (controle negativo – Ctrl), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (65 ng/mL) (controle positivo), ou com extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (500 $\mu\text{g/mL}$), fração alcaloide (Alc) (100 $\mu\text{g/mL}$) ou di-hidrocorinanteol (DHC) (50 $\mu\text{g/mL}$), e então incubados com eritrócitos de carneiro opsonizados (20×10^6 céls/mL) por 45 min. Neutrófilos fagocíticos foram determinados pela presença de um ou mais eritrócitos de carneiro no interior da célula, por leitura em microscópio óptico comum. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. ($n \geq 3$). *, $P < 0,05$ versus Ctrl (teste t de Student).

4.3.4. Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a adesão de neutrófilos

O EBH (500 $\mu\text{g/mL}$) induziu adesão de neutrófilos a células da linhagem A549 ($477,3 \pm 0,8\%$) ($P < 0,01$) (Figura 24). Da mesma forma, a fração Alc (100 $\mu\text{g/mL}$) foi efetiva em induzir a adesão neutrofilica a células A549 ($140 \pm 0,1\%$) ($P < 0,05$) (Figura 25). Ainda, o composto DHC (50 $\mu\text{g/mL}$) não alterou significativamente a adesão de neutrófilos a células da linhagem A549 ($P > 0,05$) (Figura 25).

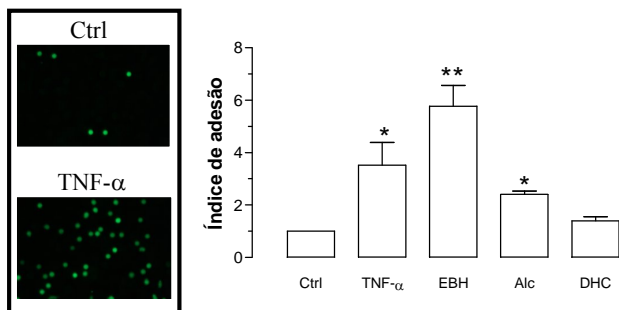


Figura 25: Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a adesão de neutrófilos a células da linhagem A549. Neutrófilos humanos (10×10^6 céls/mL) foram isolados e incubados previamente com o diluente (HBSS – DMSO 1%) (controle negativo – Ctrl), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (10 ng/mL) (controle positivo), ou com extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (500 $\mu\text{g/mL}$), fração alcaloide (Alc) (100 $\mu\text{g/mL}$) ou di-hidrocorinanteol (DHC) (50 $\mu\text{g/mL}$) por 30 min. Os neutrófilos foram marcados com calceína-AM e incubados com uma camada confluyente de células A549 por 30 min. O quadro à esquerda ilustra o grupo Ctrl comparado ao grupo TNF- α 30 min após estimulação. Os resultados foram expressos pelo índice de adesão (razão do valor absoluto de células fluorescentes na amostra pelo valor absoluto do grupo Ctrl).

4.3.5. Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a degranulação de neutrófilos

Com relação à degranulação dos neutrófilos, foi avaliada a expressão de três moléculas conhecidas por serem expressas em diferentes tipos de grânulos: CD35 (vesículas secretórias), CD66b (grânulos específicos/de gelatinase) e CD63 (grânulos azurófilos) (BINET; GIRARD, 2008; JOG et al., 2007). O EBH (500 µg/mL) e a fração Alc (100 µg/mL) promoveram significativamente a degranulação das vesículas secretórias, conforme evidenciado pelo aumento da expressão de CD35, embora tenha sido menos potente que o agonista fMLP (10 nM), utilizado como controle positivo (% de inibição: EBH: 62,2 ± 21,1, Alc: 63,2 ± 17,5) ($P < 0,05$) (Figura 26A). Já o composto DHC não foi efetivo em induzir a degranulação destes grânulos ($P > 0,05$) (Figura 26A). Com relação aos grânulos específicos/de gelatinase, nas mesmas doses, o EBH e a fração Alc, mas não o composto DHC, foram efetivos em induzir a degranulação destes grânulos (% de inibição: EBH: 43,1 ± 37,2, Alc: 46,4 ± 32,2) ($P < 0,05$) (Figura 26B). Finalmente, com relação aos grânulos azurófilos, nas mesmas concentrações, o EBH, a fração Alc e o composto DHC promoveram a degranulação destes grânulos (% de inibição: EBH: 412,6 ± 13,4, Alc: 470,9 ± 12,9, DHC: 163,9 ± 4,2) ($P < 0,01$) (Figura 26C).

4.3.6. Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a produção de EROs por neutrófilos

Com relação à produção de EROs, primeiramente avaliou-se o efeito do EBH (500 µg/mL), da fração Alc (100 µg/mL) e do composto DHC (50 µg/mL) sobre as concentrações intracelulares destas espécies reativas, quantificados pela oxidação da sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato H₂DC-FDA (MIYAJIMA et al., 1997). O EBH (500 µg/mL) foi efetivo em inibir significativamente as concentrações basais de EROs 5 a 30 min após o tratamento com o extrato (% de inibição: 5 min: 60,0 ± 0,2; 15 min: 59,7 ± 0,6; 30 min: 53,5 ±

1,2 ($P < 0,05$) (Figura 27A). A fração Alc não alterou as concentrações intracelulares basais de EROs, quando comparados ao grupo controle negativo (Ctrl) ($P > 0,05$) (Figura 27A). Já o composto DHC, aumentou significativamente a produção intracelular de EROs de 5 a 30 min após o tratamento (% de aumento: 5 min: $765,4 \pm 2,8$; 15 min: $770,8 \pm 5,1$; 30 min: $761,3 \pm 4,9$) ($P < 0,01$) (Figura 27A). Posteriormente, foi verificado se o EBH (500 $\mu\text{g/mL}$), a fração Alc (100 $\mu\text{g/mL}$) e/ou o composto DHC (50 $\mu\text{g/mL}$) foram efetivos em reverter a produção intracelular de EROs induzida pelo forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (10^{-7} M), um agonista clássico para neutrófilos. Tanto o EBH (500 $\mu\text{g/mL}$), como a fração Alc (100 $\mu\text{g/mL}$) foram efetivos em reverter este processo: EBH (% de inibição: 5 min: $91,5 \pm 1,0$; 15 min: $93,3 \pm 2,4$; 30 min: $95,3 \pm 1,4$) e Alc (% de inibição: 5 min: $47,8 \pm 5,7$; 15 min: $42,9 \pm 10,3$; 30 min: $59,9 \pm 11,8$) ($P < 0,05$) (Figura 27B). Ainda, o composto DHC (50 $\mu\text{g/mL}$) não foi efetivo em reverter este processo ($P > 0,05$) (Figura 27B).

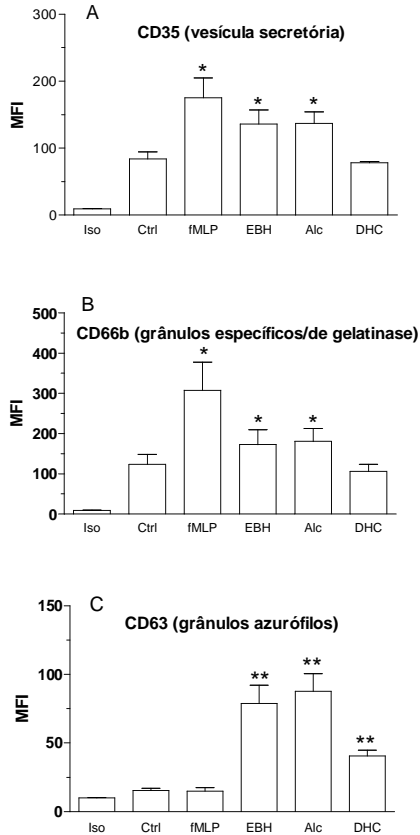


Figura 26: Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl sobre a degranulação de neutrófilos. Neutrófilos (10×10^6 céls/mL) foram isolados e incubados com o diluente (DMSO 1% em HBSS - Ctrl), com o agonista n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (10 nM) (controle positivo), extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (500 $\mu\text{g/mL}$), fração alcooide (Alc) (100 $\mu\text{g/mL}$) ou di-hidrocorinanteol (DHC) (50 $\mu\text{g/mL}$), e a degranulação foi avaliada por citometria de fluxo, por meio da expressão de CD35 (vesículas secretórias) (A), CD66b (grânulos específicos) (B) e CD63 (grânulos azurófilos) (C). Iso = controle isotípico de anticorpo IgG1. MFI = intensidade de fluorescência média. Resultados foram expressos como média \pm E.P.M. ($n = 3$) (teste t de Student).

Uma vez que a CAT inibiu o processo de apoptose induzido pelo EBH, pela fração Alc e pelo composto DHC e, tendo em vista que esta enzima degrada o H_2O_2 presente no meio extracelular, verificou-se o efeito do material vegetal sobre as concentrações extracelulares de EROs. Para isto, determinaram-se as concentrações de $O_2^{\cdot-}$ no meio extracelular, uma vez que este radical é rapidamente convertido em H_2O_2 por ação da enzima SOD. Após 5 min de estimulação, o EBH (500 $\mu\text{g/mL}$) aumentou significativamente as concentrações de $O_2^{\cdot-}$ (% de aumento: $66,4 \pm 0,7$) ($P < 0,05$) (Figura 27C). Ainda, a fração Alc (100 $\mu\text{g/mL}$) e o composto DHC (50 $\mu\text{g/mL}$) não alteraram significativamente as concentrações extracelulares de $O_2^{\cdot-}$ ($P > 0,05$) (Figura 27C). Por outro lado, nas mesmas doses estudadas, o EBH, a fração Alc e o composto DHC reduziram significativamente a produção de $O_2^{\cdot-}$ induzida pelo PMA (10^{-7} M) no tempo de 5 min (% de inibição: EBH: $66,2 \pm 0,3$; Alc: $76,9 \pm 0,2$; DHC: $80,8 \pm 0,3$) ($P < 0,01$) (Figura 27C).

4.3.7. Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a produção de citocinas/quimiocinas por neutrófilos

Dentre as 36 citocinas/quimiocinas analisadas, 12 (33,3%) tiveram o sinal de quimiluminescência detectados quando os neutrófilos foram estimulados com LPS (1000 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 28). Quando estimulados com EBH (500 $\mu\text{g/mL}$), fração Alc (100 $\mu\text{g/mL}$), ou composto DHC (50 $\mu\text{g/mL}$) a produção de citocinas/quimiocinas pelos neutrófilos não foram alteradas quando comparados ao grupo Ctrl (resultados não mostrados). No entanto, tanto o EBH (500 $\mu\text{g/mL}$), como a fração Alc (100 $\mu\text{g/mL}$) e o composto DHC (50 $\mu\text{g/mL}$) foram efetivos em inibir a produção de IL-6, MIP-1 α e MIP-1 β por neutrófilos estimulados por LPS (Figura 28). Ainda, o composto DHC inibiu a síntese de GRO- α estimulada por LPS nos neutrófilos (Figura 28).

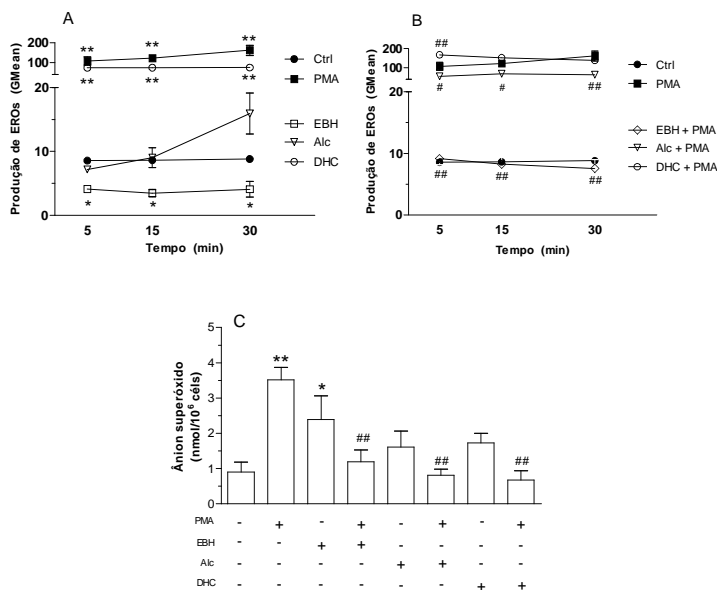


Figura 27: Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl sobre as concentrações intracelulares (A,B) e extracelulares (C) de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos. Neutrófilos (1×10^6 céls/mL) foram incubados com o diluente (DMSO 1% em HBSS - Ctrl), com o agonista forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (10-7 M) (controle positivo), extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (500 $\mu\text{g/mL}$), fração alcaloide (Alc) (100 $\mu\text{g/mL}$) ou dihidrocorinanteol (DHC) (50 $\mu\text{g/mL}$) (A), ou ainda com PMA + EBH, PMA + Alc ou PMA + DHC (B) por 5, 15 e 30 min. A produção intracelular de EROs foi avaliada por citometria de fluxo através da oxidação da sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato H₂DC-FDA (A,B). As concentrações extracelulares de EROs foram determinadas pela quantificação das concentrações extracelulares do ânion superóxido (O_2^-) 5 min após tratamento com PMA e/ou EBH, Alc ou DHC (C). Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. (n = 4). *, P < 0,05, **, P < 0,01 versus Ctrl; # P < 0,05, ##, P < 0,01 versus PMA (teste t de Student).

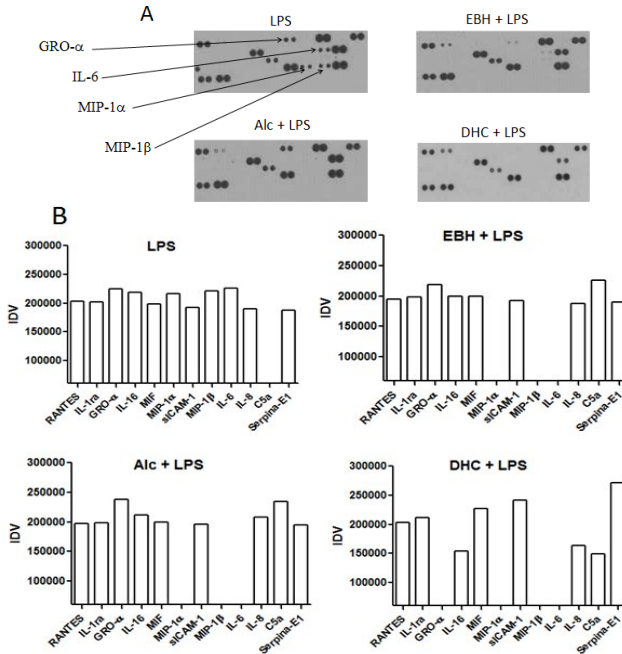


Figura 28: Efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a produção de citocinas/quimiocinas por neutrófilos. Neutrófilos humanos (10×10^6 céls/mL) foram isolados e incubados previamente com o diluente (HBSS – DMSO a 1%) (controle negativo – Ctrl), lipopolissacarídeo (LPS) (1000 $\mu\text{g/mL}$) (controle positivo), ou com extrato bruto hidroalcoólico (EBH) (500 $\mu\text{g/mL}$), fração alcaloide (Alc) (100 $\mu\text{g/mL}$) ou di-hidrocorinanteol (DHC) (50 $\mu\text{g/mL}$) na presença ou ausência de LPS por 30 min. Um pool de amostras de cada grupo testado foi adicionado às membranas contendo um conjunto de anticorpos contra 36 citocinas/quimiocinas diferentes. As seguintes citocinas/quimiocinas foram detectadas: quimiocina CCL5 (RANTES), antagonista solúvel do receptor da interleucina-1 (IL-1ra), oncogene-alfa relacionado ao crescimento (GRO- α), interleucina-16 (IL-16), fator inibitório de macrófago (MIF), proteína inflamatória de macrófago-1 alfa (MIP-1 α), molécula de adesão intercelular-1 solúvel (sICAM-1), proteína inflamatória de macrófago-1 β (MIP-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), fator do sistema complemento C5a (C5a) e Serpina-E1/ inibidor do ativador do plasminogênio-1 (Serpina E1/PAI-1). Os resultados foram expressos como valores integrados de densidade (IDV). (A) Membranas com o sinal quimiluminescente referente aos analitos detectados. (B) Gráficos com a IDV correspondente a cada uma das citocinas/quimiocinas detectadas pelo teste.

4.3.8. Efeito do beta-sitosterol sobre a captação de cálcio por neutrófilos ativados

Uma vez que o β -Sit foi um dos compostos que demonstrou melhor atividade anti-inflamatória *in vivo*, avaliou-se o papel do Ca^{2+} no efeito induzido por este composto. Para isto, primeiramente objetivou-se obter o equilíbrio do Ca^{2+} em neutrófilos murinos ativados coletados da cavidade da bolsa de ar. Desta forma, a captação basal de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0,1 $\mu\text{Ci/mL}$) foi monitorado por 15, 30, 45 e 60 min na ausência do composto β -Sit. Neste protocolo experimental, foi demonstrado que houve aumento na captação basal de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nos períodos de 30 e 45 min e que o equilíbrio dinâmico entre o influxo e o efluxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ocorreu com 45 min de incubação (Figura 29). Desta forma, para os experimentos subsequentes, foi determinado período de incubação prévia de 45 min com o $^{45}\text{Ca}^{2+}$ para o estabelecimento do equilíbrio no fluxo de Ca^{2+} antes da incubação com o β -Sit.

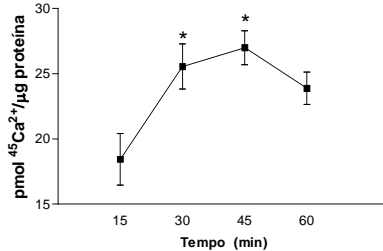


Figura 29: Curva tempo-resposta da captação basal de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em neutrófilos murinos ativados coletados da cavidade da bolsa de ar após estimulação com Cg (1%/cav) por 24 h. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. de 3 experimentos independentes realizados em quadruplicata. * $P < 0,05$ comparados ao grupo 15 min (teste *t* de Student). Tempo de incubação prévia: 15 a 60 min na presença de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0,1 $\mu\text{Ci/mL}$).

Após a obtenção do equilíbrio na captação basal de Ca^{2+} , foi realizada a avaliação das curvas tempo- e dose-resposta da captação de Ca^{2+} . Com relação à curva tempo-resposta, o β -Sit (10^{-7} M) foi efetivo em aumentar a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ após estimulações por 1 e 5 min, e não teve efeito após estimulação por 15 min (resultados não mostrados). Ainda, com relação à avaliação da curva dose-resposta em células estimuladas com β -Sit (10^{-9} a 10^{-6} M), foi observado aumento significativo com a dose de 10^{-7} M, quando comparado ao grupo controle (resultados não mostrados). Desta forma, a dose de 10^{-7} M no período de 1 min foi utilizada nos experimentos subsequentes.

Com relação ao envolvimento de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, bem como das concentrações intracelulares de Ca^{2+} no efeito estimulatório previamente observado do β -Sit na captação de Ca^{2+} , tanto a nifedipina, um bloqueador de canais de Ca^{2+} voltagem-dependente do tipo L, como o BAPTA-AM, um quelante de Ca^{2+} intracelular, foram efetivos em reverter o efeito estimulatório promovido pelo β -Sit na captação de Ca^{2+} ($P < 0,05$) (Figura 30A).

Finalmente, foi estudado o envolvimento da rede de microtúbulos, bem como a participação da enzima PI3K no efeito promovido pelo esterol em questão. Tanto a colchicina, um desestabilizador das redes de microtúbulos, como o LY294002, um inibidor seletivo da enzima PI3K reverteram a captação de Ca^{2+} promovido pelo β -Sit ($P < 0,05$) (Figura 30B).

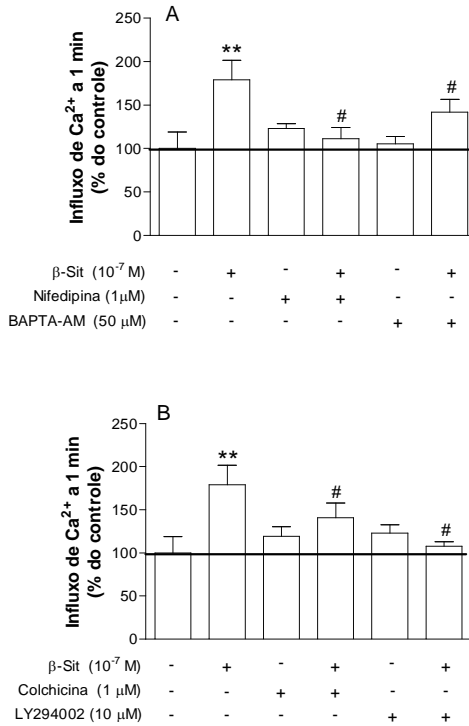


Figura 30: Envolvimento dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente do tipo L, das concentrações intracelulares de Ca^{2+} (A), da enzima fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) e da rede de microtúbulos (B) no efeito estimulatório do beta-sitosterol (β -Sit) na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em neutrófilos murinos ativados. Tempo de incubação prévia: 45 min na presença de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0,1 mCi/mL). Tempo de incubação: 1 min na presença do β -Sit e de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0,1 $\mu\text{Ci/mL}$). Nifedipina (1 μM), BAPTA-AM (50 μM), colchicina (1 μM) ou LY294002 (10 μM) foram adicionados 15 min antes da estimulação pelo β -Sit. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. de 3 experimentos independentes realizados em quadruplicata, e foram expressos como % do controle, que representa uma média de $71,4 \pm 13,6$ pmol de $^{45}\text{Ca}^{2+}/\mu\text{g}$ de proteína. ** $P < 0,01$, quando comparado ao grupo controle. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo β -Sit (teste t de Student).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se o efeito, bem como o mecanismo de ação anti-inflamatória do EBH, frações, subfrações e/ou compostos isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl., utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

Neste estudo, foi demonstrado que tanto o EBH, como as frações, subfrações e/ou compostos isolados das cascas da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. apresentaram importante efeito anti-inflamatório no modelo de inflamação induzida pela carragenina na bolsa de ar, em camundongos, uma vez que o material vegetal foi efetivo em inibir a migração leucocitária e a exsudação neste modelo experimental.

Com relação à migração leucocitária, observou-se que tanto o EBH, como as frações, subfrações e compostos isolados da planta em questão, foram efetivos em inibir este parâmetro inflamatório, sendo que a fração Alc, a subfração Apol e os compostos isolados DHC e β -Sit apresentaram melhor efeito anti-inflamatório, uma vez que em doses menores (10 mg/kg para a fração Alc e 1 mg/kg para a subfração Apol e os compostos isolados) inibiram o influxo de leucócitos para a cavidade da bolsa de ar na inflamação induzida pela carragenina, à custa de neutrófilos. Quando comparada aos fármacos de referência, o material vegetal demonstrou ser tão eficaz quanto os fármacos utilizados, indometacina e dexametasona, com relação a este parâmetro inflamatório. Além disso, é importante ressaltar que, mesmo em uma dose menor (1 mg/kg), tanto a subfração Apol, como os compostos isolados DHC e β -Sit tiveram efeito equivalente ao da indometacina (5 mg/kg) em inibir a migração leucocitária.

Diversos trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que, no modelo experimental da bolsa de ar, a inflamação induzida pela carragenina é mediada por significativa infiltração leucocitária, essencialmente de neutrófilos, quando comparada a animais tratados apenas com

solução salina estéril (grupo controle negativo) (BENINCÁ et al., 2007; VIGIL et al., 2008; LIZ et al., 2008, 2011).

Uma vez que, tanto o EBH como as frações, subfrações e compostos isolados da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. foram efetivos em inibir *in vivo* a migração leucocitária, essencialmente de neutrófilos, foi verificado se o material vegetal seria capaz de modular o processo de adesão de neutrófilos, *in vitro*. Para isto, optou-se por avaliar o efeito do EBH, da fração Alc e do composto DHC sobre a adesão de neutrófilos humanos a células epiteliais de adenocarcinoma humano da linhagem A549. Neste protocolo experimental, observou-se que o EBH e a fração Alc, mas não o composto DHC foram efetivos em aumentar a adesão das células neutrofilicas às células A549. Estes resultados sugerem que, embora a expressão de moléculas de adesão não tenha sido determinada, constituintes químicos além do composto DHC, presentes tanto no EBH como na fração Alc, parecem exercer um efeito estimulatório na adesão dos neutrófilos a células A549, o que pode estar relacionado a um aumento na expressão de moléculas de adesão pelas células neutrofilicas, dentre elas selectinas, integrinas e/ou superfamília das imunoglobulinas. Um aumento constante na expressão destas moléculas sem o devido processo de regulação pode promover a adesão constante dos neutrófilos ao endotélio vascular, podendo levar, conseqüentemente, a uma diminuição no processo de migração leucocitária.

Os neutrófilos são células efetoras, que não se diferenciam, e que normalmente permanecem na circulação por um período médio de 12 h (LUO; LOISON, 2008; FOX et al., 2010; BRATTON; HENSON, 2011). Ainda, estudos já haviam demonstrado que, quando incubados em meio de cultura RPMI, na presença de 10% de soro autólogo, 30-60% destas células entraram em apoptose espontaneamente após 24 h de incubação (SAVOIE et al., 2000). No presente estudo, foi verificado se o material vegetal seria capaz de alterar a AE de neutrófilos humanos. De maneira interessante, foi demonstrado que, tanto o EBH como a fração Alc e o composto isolado DHC foram efetivos em acelerar a apoptose de neutrófilos *in vitro*,

demonstrando que este alcaloide parece ser um dos principais responsáveis pelo efeito promovido pelo material vegetal em neutrófilos humanos, *in vitro*.

A apoptose de neutrófilos não só regula o número de células circulantes e/ou presentes no local da inflamação, como também contribui para o processamento de eventuais bactérias fagocitadas anteriormente por essas células, levando à síntese de citocinas anti-inflamatórias e à eliminação dos corpos apoptóticos por macrófagos residentes. Entretanto, durante a resposta inflamatória, ocorre um atraso no processo de morte programada dos neutrófilos, podendo levar a uma situação de neutrofilia. A sobrevivência dos neutrófilos por um período maior de tempo devido à inibição da apoptose pode promover o acúmulo destas células no local da inflamação, levando a uma liberação excessiva de metabólitos como EROs e ERNs, que levam a um efeito deletério no tecido em questão (BRATTON; HENSON, 2011; GEERING; SIMON, 2011).

Uma vez que a *Esenbeckia leiocarpa* Engl foi efetiva em induzir a apoptose de neutrófilos humanos *in vitro*, decidiu-se avaliar o mecanismo de ação pelo qual o material vegetal promoveu este efeito. Para isto, primeiramente avaliou-se a participação de diferentes caspases neste processo, utilizando-se de diferentes inibidores destas proteases. Tanto a apoptose espontânea, como aquela induzida pelo EBH, fração Alc ou pelo composto DHC, foram revertidas significativamente pela adição do inibidor não seletivo de caspases z-VAD-FMK, demonstrando a participação efetiva destas enzimas proteolíticas neste processo de inflamação. Contudo, quando foram adicionados os inibidores seletivos z-DQMD-FMK, para caspase 3, z-VEID-FMK, para caspase 6 e z-LEHD-FMK, para caspase 9, estes foram apenas efetivos em reverter a apoptose espontânea, mas não aquela induzida pelo EBH ou pela fração Alc. Por outro lado, os inibidores seletivos para caspases 3, 6 e 9 reverteram significativamente, tanto o processo de apoptose espontâneo, como aquele induzido pelo composto DHC, sugerindo que estas caspases participam efetivamente do processo de apoptose induzido por este alcaloide. Desta forma, estes resultados

comprovaram que diferentes constituintes químicos presentes no EBH, bem como na fração Alc, provavelmente induzem a apoptose de neutrófilos por vias distintas, uma vez que inibidores específicos para diferentes caspases não foram efetivos em reverter este processo. Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento de uma via alternativa de apoptose de neutrófilos, caracterizada pelo estresse do retículo endoplasmático e ativação de caspase 4 (BINET; CHIASSON; GIRARD, 2010).

Outros estudos já demonstraram que determinados alcaloides induziram a apoptose celular por mecanismos dependentes de diferentes caspases. Chen e colaboradores (2009) demonstraram que o alcaloide berberina foi efetivo em promover a apoptose de células de glioma de ratos através da ativação das caspases 3, 8 e 9. Ainda, Nakamura-López e colaboradores (2009) demonstraram que o alcaloide estaurosporina induziu a apoptose de macrófagos da linhagem P388D1, via ativação das caspases 3 e 9, assim como aumentou as concentrações de TNF- α , via ativação de caspase 8.

Em seguida, para melhor elucidação do mecanismo de ação pelo qual a planta promoveu a indução da apoptose de neutrófilos humanos, avaliou-se a participação das EROs neste processo, pela adição da enzima CAT, tanto na apoptose espontânea, como naquela induzida pela *Esenbeckia leiocarpa* Engl.. A CAT é uma enzima antioxidante responsável pela degradação do H₂O₂. De forma interessante, tanto na AE, como na apoptose induzida pelo material vegetal, o processo de apoptose celular foi completamente revertido pela adição da CAT, sugerindo que, em ambos os casos, as EROs desempenham papel importante para a indução da apoptose de neutrófilos. Estudos já haviam demonstrado que a produção de grandes quantidades de EROs, tanto pela enzima NADPH oxidase, como pela abertura de canais de K⁺ de pequena condutância ativados por Ca²⁺, medeiam o processo de apoptose nestas células (LUO; LOISION, 2008; GEERING; SIMON, 2011). Por outro lado, Yang e colaboradores (2011) demonstraram que compostos tóxicos, como a hidroquinona induziram a apoptose de

neutrófilos, no processo mediado pelo aumento na produção intracelular de EROs.

Posteriormente, uma vez que a fagocitose tem um papel fundamental na internalização e na destruição de patógenos por células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, decidiu-se avaliar o efeito do material vegetal sobre esta função exercida por neutrófilos, *in vitro*. Neste protocolo experimental, verificou-se que o EBH e a fração Alc, mas não o composto DHC, aumentaram significativamente a fagocitose de eritrócitos de carneiro exercida por neutrófilos. A presença de diferentes compostos neste extrato e/ou fração pode estar relacionada a este efeito estimulatório. Ainda, o aumento na fagocitose exercida pelos neutrófilos ocorreu 30 min após a estimulação, o que pode demonstrar um processo de ativação celular relativamente rápido, promovido por constituintes químicos presentes no EBH e/ou na fração Alc.

Embora possa ocorrer na ausência da opsonização do patógeno, a fagocitose é intensificada amplamente pela ativação dos Fc γ R e receptores do complemento (CR), levando ainda à liberação de enzimas lisossomais e promovendo o *burst* respiratório (SIMARD et al., 2011).

De maneira interessante, estudos demonstraram que a resposta gerada pela ativação destes receptores depende da presença de EROs e/ou de proteases, como a MPO, a elastase, a catepsina G e a proteinase-3. Estas, por sua vez, são liberadas pela fusão de grânulos azurófilos aos fagolisossomas, o que confere potencial atividade microbicida aos mesmos (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007; STANDISH; WEISER, 2009; VONK; NETEA; KULLBERG, 2012).

Alguns estudos avaliaram o papel dos grânulos azurófilos dos neutrófilos humanos na eliminação do agente lesivo. Nordenfelt e colaboradores (2009), utilizando tanto neutrófilos isolados de sangue periférico humano, como os diferenciados a partir da linhagem pró-mielocítica HL-60, que contém apenas grânulos azurófilos em seu citoplasma, demonstraram inicialmente que, durante o processo de formação e maturação dos fagossomas, a secreção de grânulos azurófilos ocorre

dependentemente da concentração de Ca^{2+} intracelular. Entretanto, em uma fase tardia, a secreção destes grânulos ocorre de maneira independente das concentrações de Ca^{2+} .

Uma vez que tanto o EBH como a fração Alc foram efetivos em aumentar a fagocitose exercida pelos neutrófilos e que esta função está diretamente envolvida com a liberação do conteúdo dos grânulos destas células, decidiu-se avaliar o efeito do material vegetal sobre a degranulação de neutrófilos, *in vitro*. Neste protocolo experimental, verificou-se o efeito do EBH, fração Alc ou composto DHC sobre a expressão de moléculas de superfície específicas para os grânulos: vesículas secretórias, grânulos específicos/de gelatinase e grânulos azurófilos. Neste estudo, observou-se que o EBH e a fração Alc, mas não o composto DHC, promoveram aumento significativo na degranulação celular. Este efeito parece estar diretamente relacionado a um aumento nos processos de fagocitose e adesão celular. De forma interessante, o composto DHC induziu também a degranulação de grânulos azurófilos, demonstrando um efeito estimulatório distinto daquele observado para os constituintes químicos presentes no EBH e/ou na fração Alc.

A degranulação celular promovida pelo EBH e pela fração Alc foi evidenciada em diferentes tipos de grânulos. Com relação às vesículas secretórias, a degranulação destas ocorre no início da resposta inflamatória, durante a interação dos neutrófilos com as células endoteliais. Estas vesículas endocíticas contêm grande quantidade de moléculas de adesão, como a $\beta 2$ integrina Mac-1 (SIMARD et al., 2010). Desta forma, o aumento da degranulação destas vesículas promovido pelo EBH e pela fração Alc parece estar diretamente relacionada ao aumento da adesão celular promovido por este extrato ou fração.

A secreção de grânulos específicos/de gelatinase desempenha um papel primordial no remodelamento tecidual, destruição da cartilagem, bem como no processo de transmigração celular. A liberação de enzimas como a gelatinase e a metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9) promove a degradação da matriz extracelular pela destruição do colágeno, elastina, fibronectina e laminina (O'REILLY; GAGGAR; BLALOCK,

2008). Finalmente, a liberação do conteúdo dos grânulos azurófilos em resposta a um determinado estímulo inflamatório pode ocorrer tanto no espaço extravascular, como no interior dos fagolisossomas, pela fusão àqueles grânulos (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007; SOEHNLEIN; ZERNECKE; WEBER, 2009). Portanto, o efeito promovido pelo material vegetal sobre a degranulação de grânulos específicos/de gelatinase e azurófilos parece estar diretamente relacionado ao aumento promovido pelo EBH ou fração Alc na fagocitose exercido pelos neutrófilos humanos.

Além disso, outros estudos demonstraram que o processo de degranulação pode ser induzido diretamente por proteínas intracelulares presentes nos neutrófilos. Simard e colaboradores (2010) demonstraram que a proteína S100A9, mas não S100A8 e S100A12 foi efetiva em aumentar a degranulação de vesículas secretórias, bem como de grânulos específicos/de gelatinase, além de aumentar a liberação de albumina e MMP-9 no sobrenadante de neutrófilos humanos, *in vitro* em um processo dependente das vias da p38, ERK1/2 e JNK MAPKs, evidenciando a participação de diferentes vias de sinalização celular neste processo.

O processo de degranulação de neutrófilos promove a liberação de uma grande variedade de enzimas, sendo que uma das principais delas é a MPO. Desta forma, decidiu-se avaliar o efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre as concentrações desta enzima no modelo de inflamação estudado. No presente estudo, verificou-se que o material vegetal foi efetivo em inibir as concentrações da MPO, *in vivo*. Esta enzima catalisa a reação de formação do HClO, que tem um papel fundamental nas propriedades microbicidas exercidas por essas células (VAN DER VEEN; DE WINTHER; HEERINGA, 2009; MONTESEIRÍN, 2009 SÓRIA-CASTRO et al., 2010).

A MPO está diretamente associada ao processo de ativação dos neutrófilos e sua expressão é regulada por mecanismos intracelulares, incluindo ativação de diferentes MAPKs (LORIA et al., 2008; SÓRIA-CASTRO et al., 2010). De forma interessante, apesar de o EBH, a fração Alc e o composto

DHC terem aumentado a degranulação de diferentes grânulos *in vitro*, incluindo os grânulos azurófilos, estes foram efetivos em reduzir as concentrações de MPO, *in vivo*. Estes resultados demonstraram que o efeito inibitório promovido pela *Esenbeckia leiocarpa* Engl., *in vivo*, pode estar relacionado diretamente à inibição da síntese desta enzima, uma vez que, *in vitro*, foi verificado aumento na secreção dos grânulos azurófilos. Ainda, com relação à inibição das concentrações desta enzima, foi demonstrado que o DHC parece ser um dos principais responsáveis por este efeito, uma vez que este composto foi efetivo em inibir as concentrações da MPO *in vivo*, em doses menores (1 mg/kg), quando comparado ao fármaco de referência indometacina. Outros estudos *in vivo* evidenciaram que diferentes alcaloides foram efetivos em inibir a atividade da MPO. Li e colaboradores (2011a) demonstraram que o alcaloide sofocarpina foi efetivo em inibir, tanto a migração de neutrófilos, como a atividade de MPO na lesão induzida por isquemia-reperusão, em ratos, demonstrando importante efeito anti-inflamatório para esta classe de compostos. Ainda, Yan e colaboradores (2012) demonstraram recentemente que o alcaloide berberina inibiu a atividade de MPO, bem como as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IFN- γ , quimiocina de queratinócitos (KC) e IL-17, no modelo de lesão intestinal e colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS), em camundongos.

Além das enzimas presentes nos grânulos dos neutrófilos, outras enzimas pró-inflamatórias participam do processo inflamatório mediado por estas células. Dentre estas enzimas, destaca-se a ADA. Apesar de ser considerada um marcador da ativação de células mononucleares, a ADA está indiretamente relacionada à ativação de neutrófilos, uma vez que estas células liberam adenosina, além de expressar seus quatro receptores (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3) (BARLETTA; LEY; MEHRAD, 2012). Em nosso estudo, a *Esenbeckia leiocarpa* Engl. foi efetiva em inibir as concentrações da ADA, outra enzima relacionada ao processo inflamatório. Esta enzima participa do metabolismo das purinas, sendo responsável pela degradação da adenosina em

inosina, reduzindo desta forma a disponibilidade deste nucleosídeo biologicamente ativo (DESROSIERS et al., 2007). A adenosina endógena, por sua vez, apresenta uma ação pleiotrópica, podendo apresentar diferentes efeitos, dependendo do tecido em que atua, de sua concentração e, conseqüentemente do tipo de receptor envolvido (BROWN et al., 2008; LINDEN, 2011). Alguns estudos demonstraram que a adenosina promove um efeito anti-inflamatório, principalmente pela ativação do receptor do tipo A_{2A}. Sharma e colaboradores (2010) demonstraram que a ligação da adenosina a este receptor tanto em neutrófilos como em linfócitos T CD4⁺ inibiu a lesão pulmonar induzida por isquemia-reperfusão, em camundongos, além de inibir a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-17, KC, MCP-1, MIP-1 e RANTES (CCL5). Outros estudos demonstraram que a ligação da adenosina ao receptor A_{2B} promoveu efeito pró-inflamatório, levando a liberação de citocinas e quimiocinas, como TNF- α , IL-6, KC, RANTES e MCP-1, no modelo de inflamação pulmonar induzido por isquemia-reperfusão, em camundongos (ANVARI et al., 2010). Ainda, a ativação dos receptores A₁ e A₃ promoveu a inibição da quimiotaxia de neutrófilos, bem como da atividade de MPO e da liberação de TNF- α , no modelo de inflamação pulmonar induzida por isquemia-reperfusão, em coelhos (GAZONI et al., 2010). Neste estudo, pôde-se destacar que, com relação à concentração das enzimas pró-inflamatórias MPO e ADA, tanto o EBH, como as frações, subfrações e compostos isolados da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. apresentaram perfil inibitório semelhante ao dos fármacos de referência.

Durante a resposta inflamatória, além da participação de células fagocíticas e dos inúmeros mediadores pró-inflamatórios liberados por elas, ocorrem também eventos vasculares, como a exsudação, que é caracterizada pelo extravasamento de proteínas plasmáticas, decorrente de um aumento na permeabilidade vascular e da vasodilatação (OCHOA; STEVENS, 2012). Desta forma, objetivou-se verificar também o efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl., sobre a exsudação, no modelo da inflamação induzida pela carragenina, em camundongos. Com relação à este

parâmetro, enquanto que o EBH e a fração Alc inibiram este parâmetro *in vivo*, as frações Hex e AcOEt não demonstraram o mesmo efeito. Este fato pode ser explicado pelas diferentes características químicas dos compostos presentes em cada uma destas frações. Ainda, é relevante destacar que tanto o EBH e a fração Alc, como as subfrações Pol e Apol, além do composto DHC tiveram um perfil de inibição semelhante aos fármacos indometacina e dexametasona. Além disso, a subfração Apol foi efetiva em inibir a exsudação em uma dose menor (2 mg/kg), quando comparada à indometacina (5 mg/kg). Ainda, o composto DHC inibiu a exsudação na mesma dose utilizada para a dexametasona (0,5 mg/kg).

Diversos eventos vasculares, como a vasodilatação estão diretamente relacionados a um aumento na concentração de diferentes mediadores, como é o caso do NO. Este é uma espécie reativa que, em condições fisiológicas é um dos responsáveis pela manutenção da homeostasia vascular. Contudo, durante a resposta inflamatória, o NO é sintetizado em grandes quantidades pela enzima iNOS, podendo resultar na produção de diferentes EROs e ERNs (KOBAYASHI, 2010; FORTIN et al., 2010). Desta forma, uma vez que tanto o NO como as EROs apresentam um papel primordial na eliminação do agente lesivo, ainda que estes promovam efeito deletério durante a resposta inflamatória, quando são sintetizados em excesso, optou-se por avaliar o efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre as concentrações destas espécies reativas. Para isso, primeiramente verificou-se o efeito da planta em questão sobre as concentrações dos metabólitos do NO, no modelo de inflamação estudado, *in vivo*. Neste estudo, o material vegetal foi efetivo em inibir as concentrações dos metabólitos de NO induzidas pela carragenina, em camundongos. Esta inibição parece estar diretamente relacionada à inibição da exsudação promovida pelo material vegetal, uma vez que o NO promove vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (KUBES, 1993; PHILLIPSON, KUBES, 2011).

Outros estudos também já demonstraram a participação do NO na resposta inflamatória. Elazar e colaboradores (2010) demonstraram que a síntese de NO está diretamente relacionada

a um aumento no influxo de neutrófilos no modelo de mastite induzido por infecção com *Escherichia coli*, em camundongos. Além disso, Alves e colaboradores (2009) comprovaram também que a migração de leucócitos é mediada pelo NO no modelo da peritonite induzido pela carragenina, em camundongos. Em relação à concentração dos metabólitos do NO, novamente é interessante destacar que o material vegetal demonstrou, nos experimentos realizados *in vivo*, um perfil inibitório equivalente ao observado para a indometacina e a dexametasona.

Posteriormente, decidiu-se avaliar o efeito da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. sobre a produção intra e extracelular de EROs por neutrófilos humanos. Neste trabalho, verificou-se que o EBH inibiu a produção basal de EROs, enquanto que a fração Alc não alterou este parâmetro. Interessantemente, o composto DHC promoveu aumento nas concentrações intracelulares de EROs, em neutrófilos humanos não estimulados. Este efeito pode ser atribuído à presença de diferentes compostos, tanto no EBH, como na fração Alc. Em seguida, quando os neutrófilos foram previamente estimulados com o agonista PMA, tanto o EBH, como a fração Alc e o composto DHC foram efetivos em reverter a produção intracelular de EROs. De maneira interessante, o material vegetal reverteu a produção intracelular de EROs por neutrófilos previamente ativados, o que parece sugerir que compostos presentes na planta foram efetivos em inibir especialmente concentrações elevadas de EROs liberadas pelas células neutrofilicas ativadas, o que demonstrou potencial efeito anti-inflamatório e/ou antioxidante para a *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

Além disso, optou-se por determinar o efeito do EBH, fração Alc e composto DHC sobre a produção de EROs no meio extracelular. Para isto, avaliou-se a produção extracelular de O_2^- tanto em neutrófilos não estimulados, como naqueles estimulados por PMA. Primeiramente, verificou-se que apenas o EBH promoveu aumento na produção extracelular basal de O_2^- (neutrófilos não estimulados) após um período de 5 min. Entretanto, de forma interessante, em neutrófilos estimulados com o agonista PMA, tanto o EBH, como a fração Alc e o

composto DHC foram efetivos em reverter a produção extracelular de $O_2^{\cdot-}$. Estes resultados evidenciaram que o material vegetal, aparentemente à custa do composto DHC, foi efetivo em inibir a produção excessiva de EROs induzida pelo agonista PMA, tanto no meio intra como extracelular de neutrófilos ativados. Alguns estudos já haviam evidenciado que a produção de EROs pelos neutrófilos está diretamente relacionada à liberação de armadilhas extracelulares por estas células (NETs) (YOUSEFI et al., 2009; PALMER et al., 2012).

Alguns estudos têm demonstrado o efeito inibitório de alguns alcaloides sobre a produção de EROs. Zhao e colaboradores (2012) verificaram que alguns alcaloides fenólicos foram efetivos em reduzir a produção intracelular de EROs induzida por isquemia-reperusão, tanto em cultura de córtex primário de ratos, como no modelo de oclusão da artéria cerebral, em ratos. Ainda, Bao e colaboradores (2011) demonstraram que o alcaloide rutaecarpina inibiu a produção intracelular de EROs, a expressão do RNAm para as proteínas Nox2, Nox4 e p47 (phox), bem como a liberação de lactato desidrogenase (LDH) e a atividade da NADPH oxidase induzidas por isquemia-reperusão em células da musculatura cardíaca da linhagem H9c2.

Uma vez que a resposta inflamatória é mediada diretamente pela ativação de diferentes fatores de transcrição como, por exemplo, o NF- κ B, verificou-se o efeito do material vegetal sobre a ativação deste fator de transcrição, pela degradação da proteína I κ B. Para isto, avaliou-se o efeito da planta sobre a degradação da I κ B- α neste modelo de inflamação. Com relação a este parâmetro, apenas o composto DHC foi efetivo em inibir a degradação da I κ B- α , impedindo desta forma a ativação do NF- κ B. Desta forma, pode-se sugerir que, possivelmente, outros compostos presentes no EBH, e/ou nas demais frações e subfrações da *Esenbeckia leiocarpa* Engl., como o β -Sit, podem mediar o efeito anti-inflamatório desta planta por outros mecanismos de ação.

Outros estudos demonstraram que alguns alcaloides são capazes de inibir a ativação de NF- κ B, pela inibição da degradação de I κ B- α . Zhao, Song e Deng, (2011) demonstraram

que a fração alcaloide da *Sophora alupeuroides* inibiu a fosforilação e consequente degradação da I κ B- α , no modelo da colite crônica induzida por dextran sulfato de sódio (DSS), em camundongos. Ainda, Li e colaboradores (2011b) demonstraram que o alcaloide berberina foi efetivo em inibir a degradação da I κ B- α no modelo de lesão intestinal induzido por LPS, em camundongos. Por outro lado, Valério e Awad (2011) demonstraram que o composto β -Sit apresentou outro mecanismo de ação anti-inflamatória, uma vez que este foi efetivo em inibir a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e STAT-1 e, consequentemente a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, MCP-1 e IFN- γ , bem como promoveu um aumento nas concentrações de IL-10, no processo mediado pela ativação da tirosina fosfatase SHP-1 em macrófagos murinos da linhagem J774A,1. Desta forma, pode-se sugerir que outras vias de sinalização podem estar envolvidos no mecanismo de ação anti-inflamatório exercido por outros constituintes químicos presentes na *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

A ativação de NF- κ B promove a síntese de uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma para melhor compreensão do mecanismo de ação anti-inflamatória exercido pela planta em questão, foi avaliado o efeito do material vegetal sobre a concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α .

Tanto o EBH, como as frações, subfrações e compostos isolados da *Esenbeckia leiocarpa* Engl. inibiram as concentrações de IL-1 β e TNF- α . Uma vez que ambas as citocinas são sintetizadas essencialmente por macrófagos ativados, o efeito exercido pelo material vegetal parece estar relacionado também a inibição da liberação de mediadores por macrófagos residentes ou ainda por células parenquimais presentes na cavidade da bolsa de ar.

Além disso, outros estudos evidenciaram a relação entre estas citocinas pró-inflamatórias e outras funções celulares e/ou mediadores pró-inflamatórios. Por exemplo, Alves e colaboradores (2009) demonstraram que estas citocinas mediaram o processo de rolamento e adesão dos leucócitos às células

endoteliais no modelo de peritonite induzido pela carragenina, em camundongos. Ainda, Oliveira e colaboradores (2008) demonstraram que a IL-1 β e o TNF- α estão diretamente relacionadas à exsudação, bem como à quimiotaxia leucocitária. Finalmente, Pasin e colaboradores (2010) comprovaram que a ativação destas citocinas promoveu um aumento no influxo leucocitário no modelo de febre induzida por leveduras ou por PGE₂, em ratos.

Desta forma, pode-se destacar que a inibição das concentrações de IL-1 β e TNF- α promovida pelo material vegetal, parece estar diretamente relacionada à inibição da exsudação e da migração de leucócitos na inflamação induzida pela carragenina, em camundongos. Ainda, é relevante comentar que a subfração Apol e os compostos DHC e β -Sit inibiram estes parâmetros em doses menores que aqueles animais tratados previamente com a indometacina (5 mg/kg), sugerindo um potente efeito inibitório para este parâmetro inflamatório.

Uma vez que foi demonstrado que o material vegetal foi efetivo em inibir as concentrações de citocinas *in vivo*, decidiu-se avaliar o efeito *in vitro* da planta em questão sobre as concentrações de citocinas e/ou quimiocinas sintetizadas por neutrófilos humanos estimulados por LPS. De maneira interessante, verificou-se que tanto o EBH, como a fração Alc e o composto DHC foram efetivos em inibir, *in vitro*, a produção da citocina IL-6, bem como das quimiocinas MIP-1 α e MIP-1 β induzidas por LPS, em neutrófilos humanos. Ainda, o composto DHC inibiu também a produção da quimiocina GRO- α induzida por este agonista, nos neutrófilos humanos. Desta forma, foi demonstrado que, além de inibir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, liberadas possivelmente por macrófagos residentes *in vivo*, o material vegetal foi efetivo em inibir também a produção de citocinas e/ou quimiocinas por neutrófilos ativados *in vitro*, demonstrando que a planta em questão promoveu potente efeito inibitório, possivelmente em diferentes células imunes.

Da mesma forma, alguns estudos evidenciaram que extratos contendo diferentes alcaloides foram efetivos em inibir a expressão e/ou síntese de diferentes citocinas/quimiocinas, *in*

vitro. Wang e colaboradores (2012) demonstraram que uma fração etanólica rica em alcaloides foi efetiva em inibir tanto a expressão como a concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α em macrófagos murinos da linhagem RAW 264,7 estimulados com LPS. Ainda, Chiou, Ko e Wei (2011) demonstraram que tanto o extrato etanólico, como os três alcaloides: diidroevodiamina, evodiamina e rutaecarpina inibiram a síntese das quimiocinas RANTES e MCP-1 em células epiteliais da linhagem A549 estimuladas pelo vírus influenza A (H1N1). Finalmente, Chen e colaboradores (2011b) verificaram que o sinomenina foi efetivo em inibir a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL-6, MCP-1 e CXCL8 (IL-8) em sinoviócitos do tipo fibroblasto primário estimulados com TNF- α e isolados de pacientes com artrite reumatoide.

Aparentemente, a atividade anti-inflamatória promovida pela *Esenbeckia leiocarpa* Engl., tanto *in vivo* como *in vitro* deve-se, ao menos em parte, à presença do composto DHC.

Embora não haja estudos descrevendo quaisquer atividades biológicas para o DHC, alguns estudos têm demonstrado que outros alcaloides apresentaram propriedades anti-inflamatórias. Dentre eles, destacam-se os estudos realizados por Luo e colaboradores (2010), que demonstraram que a norisoboldina inibiu a resposta inflamatória induzida por colágeno no modelo de artrite, em camundongos. Ainda, outro alcaloide, a cefarantina foi efetivo em inibir tanto a ativação do NF- κ B como as concentrações de diferentes mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, TNF- α e NO, no modelo de peritonite induzido por LPS, em ratos (KUDO et al., 2011).

Recentes estudos demonstraram que alcaloides indólicos como 16-formil-alfa-metoxistrictamina, picralinal e tubotaivina inibiram a exsudação, no modelo experimental do edema de orelha induzido por xileno, em camundongos. Ainda, estes alcaloides inibiram as concentrações de mediadores inflamatórios, como NO, PGE₂ e malonaldeído (MDA) na inflamação induzida pela carragenina, no modelo da bolsa de ar, em camundongos (SHANG et al., 2010).

Posteriormente, tendo em vista que, tanto na apoptose, como no processo de adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular, bem como em praticamente todas as funções exercidas por estas células, como fagocitose, degranulação e produção de citocinas há a participação efetiva do Ca^{2+} decidiu-se avaliar, *in vitro*, o efeito do β -Sit, uma vez que este composto apresentou efeito anti-inflamatório de maneira dose-dependente, inibindo as concentrações das enzimas MPO e ADA, bem como de NO_x , $\text{IL-1}\beta$ e $\text{TNF-}\alpha$ nos experimentos realizados *in vivo*. Desta forma, foi avaliado se o efeito inibitório promovido por este composto foi dependente da captação de Ca^{2+} em neutrófilos previamente ativados.

Os resultados demonstraram que o β -Sit promoveu aumento na captação de Ca^{2+} de forma dose- e tempo-dependente e, este aumento foi revertido, tanto pela nifedipina, um inibidor dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente do tipo L, como pelo quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM. Estes resultados sugerem que o β -Sit promoveu aumento na captação de Ca^{2+} em neutrófilos ativados pela modulação dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente do tipo L.

Outros estudos têm demonstrado que o tempo necessário para o processo de captação de Ca^{2+} está diretamente relacionado a funções efetoras, como a atividade de enzimas pró-oxidantes, nos neutrófilos (STEEL; ANDERSON, 2002). Tintinger e colaboradores (2007) demonstraram que a repolarização de membrana dependente de Ca^{2+} está implicada na atividade de enzimas com propriedades microbicidas, como a MPO. Tintinger e colaboradores (2009a) evidenciaram também que o *clearance* de Ca^{2+} intracelular depende da ativação do receptor $\text{A}_{2\text{A}}$ pela adenosina, em um processo dependente da ativação de proteína quinase A (PKA), levando a um aumento nas concentrações de AMPc, em neutrófilos.

Resultados similares já haviam sido obtidos em miométrio de ratos, em que o aumento na captação de Ca^{2+} induzido pelo β -Sit promoveu aumento nas contrações uterinas de ratas (PROMPRON et al., 2010). Ainda, o bloqueio na captação de Ca^{2+} pela utilização do quelante intracelular, demonstrou que

as concentrações intracelulares deste segundo mensageiro são necessárias para sua captação do meio extracelular.

Da mesma forma, foi demonstrado que, tanto a via da PI3K, como os microtúbulos estão envolvidos na captação de Ca^{2+} induzida pelo β -Sit em neutrófilos ativados. A ativação da PI3K é necessária durante o processo de quimiotaxia leucocitária, e está relacionada à reorganização de proteínas do citoesqueleto celular, como aquelas presentes nos microtúbulos (AKIYAMA; KAMIGUCHI, 2010).

Outros estudos já haviam demonstrado que o β -Sit possui efeito anti-inflamatório. Loizou e colaboradores (2010) demonstraram que este esterol apresentou importantes propriedades anti-inflamatórias, inibindo a expressão das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1, além de inibir a ativação do NF- κ B, em células endoteliais aórticas humanas estimuladas por TNF- α . Ding e colaboradores (2009) demonstram que o β -Sit reduziu a liberação de IL-6 e TNF- α , em macrófagos da linhagem RAW 264,7, estimulados por LPS.

Além disso, outros esteróis, como o (24-R)-5- α -stigmast-3,6-diona, o 5- α -stigmast-23-eno-3,6-diona e o 3- β -hidroxi-5- α -stigmast-24-eno foram efetivos em inibir a exsudação no modelo experimental do edema de orelha induzido por xileno, em camundongos (OKOYE et al., 2010). Islam e colaboradores, (2008) demonstraram que esteróis como fitosteril ferrulato inibiram a atividade de MPO assim como a ativação de NF- κ B em um modelo experimental de colite induzido por dextran sulfato de sódio, em camundongos.

6. CONCLUSÃO

A *Esenbeckia leiocarpa* Engl. apresentou importante efeito anti-inflamatório, que foi demonstrado em experimentos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* (Figura 31). Este efeito parece estar relacionado com a inibição da migração de leucócitos, essencialmente de neutrófilos ativados, uma vez que a planta promoveu a degranulação destas células, inibiu as concentrações de enzimas relacionadas à atividade neutrofílica (MPO e ADA), bem como inibiu a produção de EROs, aumentou a adesão e a fagocitose, além de induzir a apoptose de neutrófilos. Ainda, o extrato, frações, subfrações ou compostos isolados da planta em questão inibiram a exsudação, efeito este que pode ser explicado pela inibição das concentrações de NO e de citocinas/quimiocinas de caráter pró-inflamatório, como: IL-1 β , TNF- α , IL-6, MIP-1 α e MIP-1 β e GRO- α . O DHC parecer ser um dos responsáveis pelo efeito observado, uma vez que este composto também demonstrou efeito anti-inflamatório por meio da inibição da migração de leucócitos, enzimas e citocinas pró-inflamatórias, além de inibir a ativação do NF- κ B. Ainda, o β -Sit inibiu a resposta inflamatória de forma dependente da captação de Ca²⁺.

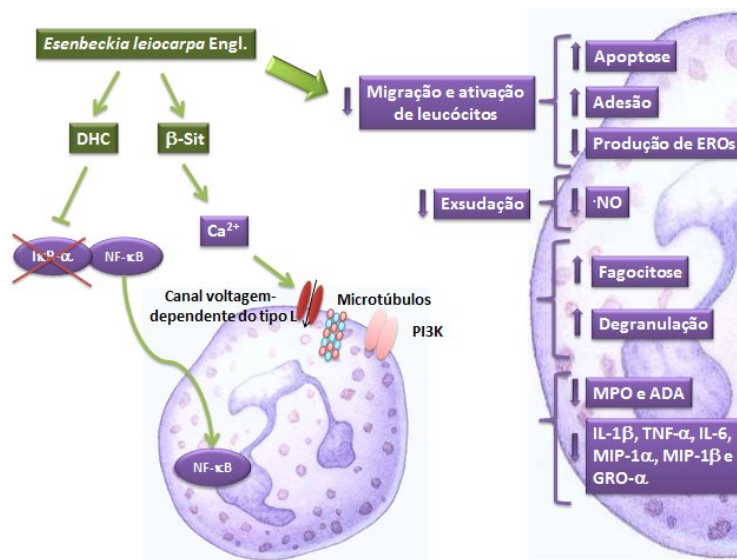


Figura 31: Proposta de mecanismo de ação anti-inflamatória para a *Esenbeckia leiocarpa* Engl.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S.K.; BRENNER, M.B.. Role of adhesion molecules in synovial inflammation. *Curr Opin Rheumatol.* v. 18, p. 268-276, 2006.
- AGUILAR-GUADARRAMA, A.B.; RIOS, M.Y.. Geranyl N-dimethylallylanthranilate, a new compound from *Esenbeckia yaaxhokob*. *Planta Med.* v. 70, p. 85-86, 2004.
- AKIYAMA, H.; KAMIGUCHI, H.. Phosphatidylinositol 3-kinase facilitates microtubule-dependent membrane transport for neuronal growth cone guidance. *J Biol Chem.* v. 285, p. 41740-41748, 2010.
- ALVES, C.F.; ALVES, V.B.; DE ASSIS, I.P.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; UBER-BUCEK, E.; DAL-SECCO, D.; CUNHA, F.Q.; REHDER, V.L.; NAPIMOGA, M.H.. Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. *J. Pharm. Pharmacol.* v. 61, p. 1097-1104, 2009.
- ANVARI, F.; SHARMA, A.K.; FERNANDEZ, L.G.; HRANJEC, T.; RAVID, K.; KRON, I.L.; LAUBACH, V.E.. Tissue-derived proinflammatory effect of adenosine A₂B receptor in lung ischemia-reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* v. 140, p. 871-877, 2010.
- AYTEKIN, M.; DWEIK, R.A.. Nitric oxide and asthma severity: towards a better understanding of asthma phenotypes. *Clin Exp Allergy.* v. 42, p. 614-616, 2012.
- BAO, M.H.; DAI, W.; LI, Y.J.; HU, C.P.. Rutaecarpine prevents hypoxia-reoxygenation-induced myocardial cell apoptosis via inhibition of NADPH oxidases. *Can J Physiol Pharmacol.* v. 89, p. 177-186, 2011.

BARLETTA, K.E.; LEY, K.; MEHRAD, B.. Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* v. 32, p. 856-864, 2012.

BASSIRI-JAHROMI, S.; DOOSTKAM, A.. Actinomyces and nocardia infections in chronic granulomatous disease. *J Glob Infect Dis.* v. 3, p. 348-352, 2011.

BELTRÁN, B.; NOS, P.; DASÍ, F.; IBORRA, M.; BASTIDA, G.; MARTÍNEZ, M.; O'CONNOR, J.E.; SÁEZ, G.; MORET, J.; PONCE, J.. Mitochondrial dysfunction, persistente oxidative damage, and catalase inhibition in imune cells of naïve and treated Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* v. 16, p. 76-86, 2010.

BENINCÁ, J.P.; MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTI, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S.. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. *Food Chem.* v. 104, p. 1097-1105, 2007.

BINET, F.; GIRARD, D.. Novel human neutrophil agonistic properties of arsenic trioxide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and/or c-jun NH2-terminal MAPK but not extracellular signal-regulated kinases-1/2. *J Leukoc Biol.* v. 84, p. 1613-1622, 2008.

BINET, F.; CHIASSON, S.; GIRARD, D.. Evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 391, p. 18-23, 2010.

BOLDIZSAR, F.; TALABER, G.; SZABO, M.; BARTIS, D.; PALINSKAS, L.; NEMETH, P.; BERKI, T.. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology.* v. 215, p. 521-527, 2010.

- BOOTH, C.; ALGAR, V.E.; XU-BAYFORD, J.; FAIRBANKS, L.; OWENS, C.; GASPAR, H.B.. Non-infectious lung disease in patients with adenosine deaminase deficient severe combined immunodeficiency. *J Clin Immunol.* v. 32, p. 449-453, 2012.
- BORREGAARD, N.. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* v. 33, p. 657-670, 2010.
- BOUEIZ, A.; HASSOUN, P.M.. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc Res.* v. 77, p. 26-34, 2009.
- BOURAÏMA-LELONG, H.; VANNESTE, M.; DELALANDE, C.; ZANATTA, L.; WOLCZYNSKI, S.; CARREAU, S.. Aromatase gene expression in immature rat Sertoli cells: age-related changes in the FSH signaling pathway. *Reprod Fertil Dev.* v. 22, p. 508-515, 2010.
- BRATTON, D.L.; HENSON, P.M.. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol.* v. 32, p. 350-357, 2011.
- BRITO, F.D.. Pleurisy and pouch models of acute inflammation. In: Liss, A.A.R. (Ed.), *Pharmacological Methods in The Control of Inflammation.* Rhone Poulenc, Dagenham, pp. 173–228, 1989.
- BROWN, R.A.; SPINA, D.; PAGE, C.P.. Adenosine receptors and asthma. *Br. J. Pharmacol.* v. 153, p. S446-456, 2008.
- CARDOSO-LOPES, E.M.; MAIER, J.A.; DA SILVA, M.R.; REGASINI, L.O.; SIMOTE, S.Y.; LOPES, N.P.; PIRANI, J.R.; BOLZANI, V. DA S.; YOUNG, M.C.. Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer disease. *Molecules.* v. 15, p. 9205-9213, 2010.
- CARVALHO, L. H.; BRANDÃO, M. G.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J. L.; KRETTLI, A.U.. Antimalarial activity of crude

extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. *Braz J Med Biol Res.* v. 24, p. 1113-1123, 1991.

CHAM, B.P.; GERRARD, J.M.; BAINTON, D.F.. Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation. *Am J Pathol.* v. 144, p. 1369-1380, 1994.

CHANNUAL, J.; WU, J.J.; DANN, F.J.. Effects of tumor necrosis factor-alpha blockade on metabolic syndrome components in psoriasis and psoriatic arthritis and additional lessons learned from rheumatoid arthritis. *Dermatol Ther.* v. 22, p. 61-73, 2009.

CHEN, T.C.; LAI, K.C.; YANG, J.S.; LIAO, C.L.; HSIA, T.C.; CHEN, G.W.; LIN, J.J.; LIN, H.J.; CHIU, T.H.; TANG, Y.J.; CHUNG, J.G.. Involvement of reactive oxygen species and caspase-dependent pathway in berberine-induced cell cycle arrest and apoptosis in C6 rat glioma cells. *Int J Oncol.* v. 34, p. 1681-1690, 2009.

CHEN, L.Q.; ROHATGI, A.; AYERS, C.R.; DAS, S.R.; KHERA, A.; BERRY, J.D.; MCGUIRE, D.K.; DE LEMOS, J.A.. Race-specific associations of myeloperoxidase with atherosclerosis in a population-based sample: the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis.* v. 219, p. 833-838, 2011a.

CHEN, D.P.; WONG, C.K.; LEUNG, P.C.; FUNG, K.P.; LAU, C.B.; LAU, C.P.; LI, E.K.; TAM, L.S.; LAM, C.W.. Anti-inflammatory activities of Chinese herbal medicine sinomenina and Liang Miao San on tumor necrosis factor- α -activated human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *J Ethnopharmacol.* v. 137, p. 457-468, 2011b.

CHIOU, W.F.; KO, H.C.; WEI, B.L.. *Evodia rutaecarpa* and three major alkaloids abrogate influenza A virus (H1N1)-induced chemokines production and cell migration. *Evid Based Complement Alternat Med.* v. 2011, p. 1-10, 2011.

CHOI, D.K.; PENNATHUR, S.; PERIER, C.; TIEU, K.; TEISMANN, P.; WU, D.C.; JACKSON-LEWIS, V.; VILA, M.; VONSATTEL, J.P.; HEINECKE, J.W.; PRZEDBORSKI, S.. Ablation of the inflammatory enzyme myeloperoxidase mitigates features of Parkinson's disease in mice. *J Neurosci.* v. 25, p. 6594-6600, 2005.

CLARK, J.M.. Uptake of colloidal thorium dioxide by the mouse connective tissue mast cell. *Tex. Rep. Biol. Med.* v. 33, p. 397-406, 1975.

DAVIS, L.S.; HUTCHESON, J.; MOHAN, C.. The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *J Interferon Cytokines Res.* v. 31, p. 781-789, 2011.

DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; ELEWAUT, D.. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. *Curr Opin Pharmacol.* v. 10, p. 497-504, 2010.

DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; DE MORAES & SOUZA, M. A.. *Gazz. Chin. Ital.* v. 119, p. 435-439, 1989.

DINARELLO, C.A.. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol.* v. 41, p. 1203-1217, 2011a.

DINARELLO, C.A.. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* v. 117, p. 3720-3722, 2011b.

DING, Y.; NGUYEN, H.T.; KIM, S.I.; KIM, H.W.; KIM, Y.H.. The regulation of inflammatory cytokine secretion in macrophage cell line by the chemical constituents of *Rhus sylvestris*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* v. 19, p. 3607-3610, 2009.

DOLABELA, M. F.; OLIVEIRA, S. G.; NASCIMENTO, J. M.; PERES, J. M.; WAGNER, H.; PÓVOA, M. M.; DE OLIVEIRA, A. B.. *In vitro* antiplasmodial activity of extract and constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon. *Phytotherapy*. v. 15, p. 367-372, 2008.

DUARTE, D.B.; VASKO, M.R.; FEHRENBACHER, J.C.. Models of inflammation: carrageenan air pouch. *Curr Protoc Pharmacol.* v. 5, p. 5-6, 2012.

EDER, C.. Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology.* v. 214, p. 543-553, 2009.

EKMAN, A.K.; CARDELL, L.O.. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology.* v. 130, p. 55-63, 2010.

ELAZAR, S.; GONEN, E.; LIVNEH-KOL, A.; ROSENSHINE, I.; SHPIGEL, N.Y.. Essential role of neutrophils but not mammary alveolar macrophages in a murine model of acute *Escherichia coli* mastitis. *Vet Res.* v. 41, p. 53, 2010.

ENNACIRI, J.; GIRARD, D.. IL-4R α , a new member that associates with Syk kinase: implication in IL-4-induced human neutrophil functions. *J. Immunol.* v. 183, p. 5261-5269, 2009.

FARID, T.M.; ABD EL BAKY, A.M.; KHALEFA, E.S.; TALAAT, A.A.; MOHAMED, A.A.; GHEITA, T.A.; ABDEL-SALAM, R.F.. Association of tumor necrosis-factor-alpha gene polymorphisms with juvenile systemic lupus erythematosus

nephritis in a cohort of Egyptian patients. *Iran J Kidney Dis.* v. 5, p. 392-397, 2011.

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G.P.. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med.* v. 42, p. 153-164, 2007.

FLYVBJERG, A.. Diabetic angiopathy, the complement system and the tumor necrosis factor superfamily. *Nat Rev Endocrinol.* v. 6, p. 94-101, 2010.

FORTIN, C.F.; MCDONALD, P.P.; FÜLÖP, T.; LESUR, O.. Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair. *Shock.* v. 33, p. 344-352, 2010.

FOX, S.; LEITCH, A.E.; DUFFIN, R.; HASLETT, C.; ROSSI, A.G.. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun.* v. 2, p. 216-227, 2010.

GALLI, S.J.; BORREGAARD, N.; WYNN, T.A.. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* v. 12, p. 1035-1044, 2011.

GAZONI, L.M.; WALTERS, D.M.; UNGER, E.B.; LINDEN, J.; KRON, I.L.; LAUBACH, V.E.. Activation of A₁, A_{2A} or A₃ adenosine receptors attenuates lung ischemia-reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* v. 140, p. 440-446, 2010.

GEERING, B.; SIMON, H.U.. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ.* v. 18, p. 1457-1469, 2011.

GIORGETTI, M.; NEGRIS, G.; RODRIGUES, E.. Brazilian plants with possible action on the central nervous system: a study of historical sources from the 16th to 19th century. *J.*

Ethnopharmacol. v. 109, p. 338-347, 2007.

GIRARD, D.; GOSSELIN, J.; HEITZ, D.; PAQUIN, R.;
BEAULIEU, A.D.. Effects of interleukin-2 on gene expression in
human neutrophils. *Blood.* v. 86, p. 1170-1176, 1995.

GIRARD, D., PAQUET, M.E., PAQUIN, R., BEAULIEU, A.D..
Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human
neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton
rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood,*
v. 88, p. 3176-3184, 1996.

GIUSTI, G.; GALANTI, B.. Adenosine deaminase: colorimetric
method. In: BERGMAYER, H. U. *Methods of enzymatic
analysis.* New York: Verlag Chemie, 315-323, 1984.

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

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

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B.. Apoptosis:
programmed cell death. *Rev Bras Cancer.* v. 53, p. 335-343,
2007.

HÄCKER, H.G.; SISAY, M.T.; GÜTSCHOW, M.. Allosteric
modulation of caspases. *Pharmacol Ther.* v. 132, p. 180-195,
2011.

HAYASHI, F.; MEANS, T.K.; LUSTER, A.D.. Toll-like
receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* v. 102, p.
2660-2669, 2003.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S.. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* v. 26, p. 203-234, 2012.

HERNDON, B.L; ABBASI, S.; BENNETT, D.; BAMBERGER, D.. . Calcium binding proteins MRP 8 and 14 in a *Staphylococcus aureus* infection model: role of therapy, inflammation, and infection persistence. *J. Lab. Clin. Med.* v. 141, p. 110–120, 2003.

HUNG, C.; YEN, G.. Extraction and identification of antioxidative components of Hsian-tsoa (*Mesona procumbens* Hemsl.). *Lebenson Wiss Technol.* v. 34, p. 306–311. 2001.

ISLAM, M.S.; MURATA, T.; FUJISAWA, M.; NAGASAKA, R.; USHIO, H.; BARI, A.M.; HORI, M.; OZAKI, H.. Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *Br J Pharmacol*, v. 154, p. 812-824, 2008.

JOG, N.R.; RANE, M.J.; LOMINADZE, G.; LUERMAN, G.C.; WARD, R.A.; MCLEISH, K.R.. The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* v. 292, p. C1690–C1700, 2007.

KAASTRA, R. C.. *Esenbeckia* (Rutaceae). *Acta Biot. Neert*, v. 26, p. 471-476, 1977.

KAMAL, A.M.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M.. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 100, p. 39-47, 2005.

KAPLAN, M.; MUTLU, E.A.; BENSON, M.; FIELDS, J.Z.; BANAN, A.; KESHAVARZIAN, A.. Use of herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders. *Complementary Therapies in Medicine*, v. 15, p. 207-216, 2007.

- KAROU, S.D.; TCHACONDO, T.; ILBOUDO, D.P.; SIMPORE, J.. Sub-Saharan *Rubiaceae*: a review of their traditional uses, phytochemistry and biological activities. *Pak J Biol Sci.* v. 14, p. 149-169, 2011.
- KELLEHER, Z.T.; MATSUMOTO, A.; STAMLER, J.S.; MARSHALL, H.E.. NOS2 regulation of NF-kappa B by S-nitrosylation of p65 *J. Biol. Chem.* v. 282, p. 30667-30672, 2007.
- KENNEDY, A.D.; WILLMENT, J.A.; DORWARD, D.W.; WILLIAMS, D.L.; BROWN, G.D.; DELEO, F.R.. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol.* v. 37, p. 467-478, 2007.
- KINO, T.; SU, Y.A.; CHROUSOS, G.P.. Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci.* v. 66, p. 3435-3448, 2009.
- KOBAYASHI, Y.. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol.* v. 88, p. 1157-1162, 2010.
- KOELZER, J.; PEREIRA, D.A.; DALMARCO, J.B.; PIZZOLATTI, M.G.; FRÖDE, T.S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. *Food Chem.* v. 117, p. 444-450, 2009.
- KOH, T.J.; DIPIETRO, L.A.. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med.* v. 13: e23, 2011.
- KUBES, P.. Polymorphonuclear leukocyte-endothelium interactions: a role for pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. *Can J Physiol Pharmacol.* v. 71, p. 88-97, 1993.

KUDO, K.; HAGIWARA, S.; HASEGAWA, A.; KUSAKA, J.; KOGA, H.; NOGUCHI, T.. Cepharanthine exerts anti-inflammatory effects via NF-kappa B inhibition in a LPS-induced rat model of systemic inflammation. *J. Surg. Res.* v. 171, p. 199-204, 2011.

KUMAR, P., SHEN, Q., PIVETTI, C.D., LEE, E.S., WU, M.H., YUAN, S.Y.. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert. Rev. Mol. Med.* v. 11: e19, 2009.

KUMAR, V.; SHARMA, A.. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol.* v. 10, p. 1325-1334, 2010.

LAMKANFI, M.; FESTJENS, N.; DECLERCQ, W.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P.. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.* v. 14, p. 44-55, 2007.

LAVASTRE, V., PELLETIER, M., SALLER, R., HOSTANSKA, K., GIRARD, D.. Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I induced human neutrophil apoptosis: *Viscum album* agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *J. Immunol.* V. 168, p. 1419-1427, 2002.

LEE, Y.H.; LEE, H.S.; CHOI, S.J.; JI, J.D.; SONG, G.G.. Associations between eNOS polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Inflamm Res.* v. 61, p. 135-141, 2012.

LI, R.N.; HUNG, Y.H.; LIN, C.H.; CHEN, Y.H.; YEN, J.H.. Inhibitor I kappa-B-alpha promotes functional polymorphisms in

patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol.* v. 30, p. 676-680, 2010.

LI, C.; GAO, Y.; TIAN, J.; SHEN, J.; XING, Y.; LIU, Z.. Sophocarpine administration preserves myocardial function from ischemia-reperfusion in rats via NF- κ B inactivation. *J Ethnopharmacol.* v. 135, p. 620-625, 2011a.

LI, H.M.; WANG, Y.Y.; WANG, H.D.; CAO, W.J.; YU, X.H.; LU, D.X.; QI, R.B.; HU, C.F.; YAN, Y.X.. Berberine protects against lipopolysaccharide-induced intestinal injury in mice via alpha 2-adrenoceptor-independent mechanisms. *Acta Pharmacol Sin.* v. 32, p. 1364-1372, 2011b.

LIM, L.H.; PERVAIZ, S.. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J.* v. 21, p. 968-975, 2007.

LINDEN, J.. Regulation of leukocyte function by adenosine receptors. *Adv Pharmacol.* v. 61, p. 95-114, 2011.

LIU, G.L.; LI, Y.C.; SHEN, Y.. Inhibitory effect of total glucosides of paeonia on the NF- κ B/p65 protein expression in paws of RA rats. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* v. 26, p. 1082-1084, 2010.

LIZ, R.; VIGIL, S.V.G.; GOULART, S.; MORITZ, M.I.G.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S.. The anti-inflammatory modulatory role of *Solidago chilensis* Meyen in the murine model of the air pouch. *J. Pharm. Pharmacol.* v. 60, p. 512-521, 2008.

LIZ, R.; PEREIRA, D.F.; HORST, H.; DALMARCO, E.M.; DALMARCO, J.B.; SIMIONATTO, E.L.; PIZZOLATTI, M.G.; GIRARD, D.; FRÖDE, T.S.. Protected effect of *Esenbeckia leiocarpa* upon the inflammatory response induced by carrageenan in a murine air pouch model. *Int Immunopharmacol.* v. 11, p. 1991-1999, 2011.

LOIZOU, S.; LEKAKIS, I.; CHROUSOS, G.P.;
MOUTSATSOU, P.. Beta-sitosterol exhibits anti-inflammatory
activity in human aortic endothelial cells. *Mol. Nutr. Food. Res.*
v. 54, p. 551-558, 2010.

LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D.. Understanding the
mechanism of IL-1b secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* v.
22, p. 189-195, 2011.

LORIA, V.; DATO, I.; GRAZIANI, F.; BIASUCCI, L.M..
Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic
heart disease and acute coronary syndromes. *Med Inflamm.*
135625, 2008.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.;
RANDALL, R.J.. Protein measurement with the Folin-Phenol
reagents. *J Biol Chem.* v. 193, p. 265-275, 1951.

LUO, Y.; LIU, M.; XIA, Y.; DAI, Y.; CHOU, G.; WANG, Z..
Therapeutic effect of norisoboldine, na alkaloid isolated from
Radix linderae, on collagen-induced arthritis in mice.
Phytomedicine, v. 17, p. 726-731, 2010.

LUO; H.; LOISON, F.. Constitutive neutrophil apoptosis:
mechanisms and regulation. *Am J Hematol.* v. 83, p. 288-295,
2008.

MAEDLER, K.; DHARMADHIKARI, G.; SCHUMANN, D.M.;
STORLING, J.. Interleukin-targeted therapy for metabolic
syndrome and type 2 diabetes. *Handb Exp Pharmacol.* v. 203, p.
257-278, 2011.

MAIANSKI, N.A.; GEISLER, J.; SRINIVASULA, S.M.;
ALNEMRI, E.S.; ROOS, D.; KUIJPERS, T.W.. Functional
characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted
to apoptosis. *Cell Death Differ.* v. 11, p. 143–153, 2004.

MALLE, E.; FURTMÜLLER, P.G.; SATTLER, W.; OBINGER.. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol.* v. 152, p. 838-854, 2007.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M.. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol.* v. 37, p. 14-16, 2007.

MANTOVANI, A.. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med.* v. 10, p. 369-373, 2010.

MARKUS, R.P.; AFECHE, S.C.; BARBOSA JR.; E.M.; LOTUFO, C.M.C.; FERREIRA, Z.S.; CIPOLLA-NETO, J.. Glândula Pineal e Melatonina. Disponível em <<http://www.crono.icb.usp.br/glandpineal.htm>>. Acesso em 15/03/2012.

MARIOTTO, S.; SUZUKI, Y.; PERSICHINI, T.; COLASANTI, M.; SUZUKI, H.; CANTONI, O.. Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. *Curr. Med. Chem.* v. 14, p. 1940-1944, 2007.

MASSIOT, G.; THEPENIER, P.; JACQUIER, M.J.; MEN-OLIVIER, L.L.; VERPOORTE, R.; DELAUDE, C.. Alkaloids of *Strychnos johnsonii*. *Phytochemistry.* v. 26, p. 2839-2846, 1987.

MARKATSELI, T.E.; ALAMANOS, Y.; SAOUGOU, I.; VOULGARI, P.V.; DROSOS, A.A.. Survival of TNF-alpha antagonists in rheumatoid arthritis: a long-term study. *Clin Exp Rheumatol.* v. 30, p. 31-38, 2012.

MEDZHITOV, R.. Origin and physiological roles of inflammation. *Nat Rev.* v. 454, p. 428,435, 2008.

MEDZHITOV R, HORNG T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol.* v. 9, p. 692-703, 2009.

MENEGAZ, D.; BARRIENTOS-DURAN, A.; KLINE, A.; SILVA, F.R.; NORMAN, A.W.; MIZWICKI, M.T.; ZANELLO, L.P.. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D3 stimulation of secretion via chloride channel activation in Sertoli cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. v. 119, p. 127-134, 2010a.

MENEGAZ, D.; ROYER, C.; ROSSO, A.; SOUZA, A.Z.; SANTOS, A.R.; SILVA, F.R.. Rapid stimulatory effect of thyroxine on plasma membrane transport systems: calcium uptake and neutral amino acid accumulation in immature rat testis. *Int J Biochem Cell Biol*. v. 42, p. 1046-1051, p. 2010b.

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

MIYAJIMA, A., NAKASHIMA, J., TACHIBANA, M., TAZAKI, H., MURAI, M.. Role of reactive oxygen species in *cis*-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Br. J. Cancer*. v. 76, p. 206-210, 1997.

MONTANHER, A.B., ZUCOLOTTO, S.M., SCHENKEL, E.P., FRÖDE, T.S.. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *J Ethnopharmacol*. v. 109, p. 281-288, 2007.

MONTESEIRÍN, J.. Neutrophils and Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. v. 19, p. 340-354, 2009.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P.. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol*. v. 8, p. 958-969, 2008.

MOULDING, D.A.; AKGUL, C.; DEROUET, M.; WHITE, M.R.; EDWARDS, S.W.. Bcl-2 family expression in human

neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J Leukoc Biol.* v. 70, p. 783–792, 2001.

MURPHY, B.M.; O'NEILL, A.J.; ADRAIN, C.; WATSON, R.W.; MARTIN, S.J.. The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome C. *J Exp Med* v. 197, p. 625–632, 2003.

NAKAMURA-LÓPEZ, Y.; SARMIENTO-SILVA, R.E.; MORAN-ANDRADE, J.; GÓMEZ-GARCÍA, B.. Staurosporine-induced apoptosis in P388D1 macrophages involves both extrinsic and intrinsic pathways. *Cell Biol Int.* v. 33, p. 1026-1031, 2009.

NAKATSU, T.; JOHNS, T.; KUBO, I.; MILTON, K.; SAKAI, M.; CHATANI, K.; SAITO, K.; YAMAGIWA, Y.; KAMIKAWA, T.. Isolation, structure, and synthesis of novel 4-quinolinone alkaloids from *Esenbeckia leiocarpa*. *J Nat Prod.* v. 53, p. 1508-1513, 1990.

NAPOLITANO, H. B.; SILVA, M.; ELLENA, J.; RODRIGUES, B. D.; ALMEIDA, A. L.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G.; THIEMANN, O. H.. Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania* major promastigotes. *Braz J Med Biol Res.* v. 37, p. 1847-1852, 2004.

NEHER, J.J.; NENISKYTE, U.; BROWN, G.C.. Primary phagocytosis of neurons by inflamed microglia: potential roles in neurodegeneration. *Front Pharmacol.* v. 3, p. 27, 2012.

NETEA, M. G.; SIMON, A.; VAN DE VEERDONK, F.; KULLBERG, B.J.; VAN DER MEER, J.W.; JOOSTEN, L.A.. IL-1 beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog.* v. 6, e 1000661, 2010.

NOGUEIRA DE MELO, G.A., GRESPLAN, R., FONSECA, J.P., FARINHA, T.O., SILVA, E.L., ROMERO, A.L., BERSANI-AMADO, C.A., CUMAN, R.K.. *Rosmarinus officinalis* L. essential oil inhibits *in vivo* and *in vitro* leukocyte migration. *J Med Food*. v. 14, p. 944-946, 2011.

NORDENFELT, P.E.; WINBERG, M.E.; LÖNNBRON, P.; RASMUSSEN, B.; TAPPER, H.. Different requirements for early and late phases of azurophilic granule-phagosome fusion. *Traffic*. v. 10, p. 1881-1893, 2009.

NORDENFELT, P.; TAPPER, H.. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol*. v. 90, p. 271-284, 2011.

NOVAKOVA, M.; DOLEZAL, T.. Expression of Drosophila adenosine deaminase in immune cells during inflammatory response. *PLoS*. v. 6, p. e17741, 2011.

NUNES, F. M.; BARROS-FILHO, B. A.; DE OLIVEIRA, M. C.; ANDRADE-NETO, M.; DE MATTOS, M.C.; MAFEZOLI, J.; PIRANI, J.R.. ¹H and ¹³C NMR spectra of 3,8-dimethoxyfuro[3,2-g]coumarin and maculine from *Esenbeckia grandiflora* Martius (Rutaceae). *Magn Reson Chem.*, v. 43, p. 864-866, 2005.

OCHOA, C.D.; STEVENS, T.. Studies on the cell biology of interendothelial cell gaps. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. v. 302, p. L275-286, 2012.

OKOYE, F.B.; OSADEBE, P.O.; PROKSCH, P.; EDRADA-EBEL, R.A.; NWORU, C.S.; ESIMONE, C.O.. Anti-inflammatory and membrane-stabilizing stigmastane steroids from *Alchornea floribunda* leaves. *Planta Med.*, v. 76, p. 172-177, 2010.

OKUDAIRA, M.; SCHWARZ, J.. *Histoplasma capsulatum* infection in rat air pouch. *Archs. Pathol.* v. 74, p. 239-243, 1962.

OLIVEIRA, S.H.P., CANETTI, C., RIBEIRO, R.A., CUNHA, F.Q.. Neutrophil migration induced by IL-1 β depends upon LTB₄ released by macrophages and upon TNF- α and IL-1 β released by mast cells. *Inflammation*, v. 31, p. 36-46, 2008.

O'REILLY, P.J.; GAGGAR, A.; BLALOCK, J.E.. Interfering with extracellular matrix degradation to blunt inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* v. 8, p. 242-248, 2008.

PAINO, I.M.; MIRANDA, J.C.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; CESARINO, E.J.; DE CASTRO, F.A.; DE SOUZA, A.M.. Phagocytosis and nitric oxide levels in rheumatic inflammatory states in elderly women. *J Clin Lab Anal.* v. 25, p. 47-51, 2011.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S.. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* v. 20, p. 87-103, 2010.

PASIN, J.S.; FERREIRA, A.P.; SARAIVA, A.L.; RATZLAFF, V.; ANDRGHETTO, R.; TOMAZETTI, J.; AVILA, D.S.; ALVES, S.H.; RUBIN, M.A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.; MELLO, C.F.. Diacerein decreases TNF- α and IL-1 β levels in peritoneal fluid and prevents Baker's yeast-induced fever in young rats. *Inflamm. Res.* v. 59, p. 189-196, 2010.

PALMER, L.J., COOPER, P.R., LING, M.R., WRIGHT, H.J., HUISOON, A., CHAPPLE, I.L.. Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin Exp Immunol.* V. 167, p. 261-268, 2012.

PELLETIER, M.; ROBERGE, C.J.; GAUTHIER, M.; VANDAL, K.; TESSIER, P.A.; GIRARD, D.. Activation of human neutrophils *in vitro* and dieldrin-induced neutrophilic inflammation *in vivo*. *J. Leukoc. Biol.* v. 70, p. 367-373, 2001.

PELLETIER, M.; RATTHÉ, C.; GIRARD, D.. Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2. *FEBS Lett.* v. 532, p. 164-170, 2002.

PELLETIER, M.; GIRARD, D.. Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils *in vivo*. *Clin. Exp. Immunol.* v. 141, p. 315-325, 2005.

PETERSON, L.J.; FLOOD, P.M.. Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. *Mediators Inflamm.* v 2012, p. 401264, 2012.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P.. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.* v. 17, p. 1381-1390, 2011.

POLLARD, J.W.. Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.* v. 9, p. 259-270, 2009.

POZZATTI, P.; DOS REIS, G.O.; PEREIRA, D.F.; HELLER, M.; MICKE, G.A.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M.G.; FRÖDE, T.S.. *Esenbeckia leiocarpa* Engl. inhibits inflammation in a carrageenan-induced murine model of pleurisy. *J Pharm Pharmacol.* v. 63, p. 1091-1102, 2011.

PROMPROM, W.; KUPITTAYANANT, P.; INDRAPICHATE, K.; WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S.. The effects of pomegranate seed extract and beta-sitosterol on rat uterine contractions. *Reprod Sci.* v. 17, p. 288-296, 2010.

QIU, P.; CUI, X.; BAROCHIA, A.; LI, Y.; NATANSON, C.; EICHACKER, P.Q.. The evolving experience with therapeutic TNF inhibition in sepsis: considering the potential influence of

risk of death. *Expert Opin Investig Drugs*. v. 20, p. 1555-1564, 2011.

RANI, S.; KHAN, S.A.; ALI, M.. Phytochemical investigation of the seeds of *Althea officinalis* L. *Nat. Prod. Res.* v. 24, p. 1358-1364, 2010.

RAO, TS; CURRIE, JL; SHAFFER, AF; ISAKSON, PC.. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation*, v.17, p. 723-741, 1993.

REIS, S.R.; VALENTE, L.M.; SAMPAIO, A.L.; SIANI, A.C.; GANDINI, M.; AZEREDO, E.L.; D'AVILA, L.A.; MAZZEI, J.L.; HENRIQUES, M.G.; KUBELKA, C.F.. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *Int Immunopharmacol.* v. 8, p 468-476, 2008.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; SOUSA, M.H.L.P. Anti-inflamatórios não-hormonais e COXIBEs. In: Dor – Princípios e Prática. Disponível em: <<http://dc152.4shared.com/img/t9Um3PnC/preview.html>>. Acesso em: 27/03/2012.

RODRIGUES, M.R., KANAZAWA, L.K., DAS NEVES, T.L., DA SILVA, C.F., HORST, H., PIZZOLATTI, M.G., SANTOS, A.R. BAGGIO, C.H., WERNER, M.F.. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. *J Ethnopharmacol.* v. 139, p. 519-526, 2012.

SADIK, C.D.; KIM, N.D.; LUSTER, A.D.. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* v. 32, p. 452-460, 2011.

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

SANDBORN, W.J.; VAN ASSCHE, G.; REINISCH, W.; COLOMBEL, J.F.; D'HAENS, G.; WOLF, D.C.; KRON, M.; TIGHE, M.B.; LAZAR, A.; THAKKAR, R.B.. Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology.* v. 142, p. 257-265, 2012.

SAVOIE, A.; LAVASTRE, V.; PELLETIER, M.; HAJTO, T.; HOSTANSKA, K.; GIRARD, D.. Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I : modulation of *de novo* protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *J Leukoc Biol.* v. 68, p. 845-853, 2000.

SCHEEL-TOELLNER, D.; WANG, K.; CRADDOCK, R.; WEBB, P.R.; MCGETTRICK, H.M.; ASSI, L.K.; PARKES, N.; CLOUGH, L.E.; GULBINS, E.; SALMON, M.; LORD, J.M.. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signalling. *Blood.* v. 104, p. 2557-2564, 2004.

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A.. In: HANDBOOK OF INFLAMMATION. *Iniciation of inflammatory response and its prevention.* New York, 1985. p. 27-47.

SHAFTEL, S.S.; GRIFFIN, W.S.; O'BANION, M.K.. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation.* v. 5, p. 7, 2008.

SHANG, J.H.; CAI, X.H.; FENG, T.; ZHAO, Y.L.; WANG, J.K.; ZHANG, L.Y.; YAN, M.; LUO, X.D.. Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: anti-inflammatory and analgesic effects. *J. Ethnopharmacol.*, v. 129, p. 174-181, 2010.

SHARMA, A.K.; LAUBACH, V.E.; RAMOS, S.I.; ZHAO, Y.; STUKENBORG, G.; LINDEN, J.; KRON, I.L.; YANG, Z.. Adenosine A₂A receptor activation on CD4⁺ T lymphocytes and neutrophils attenuates lung ischemia-reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* v. 139, p. 474-482, 2010.

SILVA, J.R.; RAMOS A.S.; MACHADO, M.; DE MOURA, D.F.; NETO, Z.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; FIGUEIREDO, P.; DO ROSÁRIO, V.E.; AMARAL, A.C.; LOPES, D.. A review of antimalarial plants used in traditional medicine in communities in Portuguese-speaking countries: Brazil, Mozambique, Cape Verde, Guinea-Bissau, São Tomé and Príncipe and Angola. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 106, p. 142-158, 2011.

SIMARD, J.C.; GIRARD, D.; TESSIER, P.A.. Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol.* v. 87, p. 905-914, 2010.

SIMARD, J.C.; SIMON, M.M.; TESSIER, P.A.; GIRARD, D.. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol.* v. 186, p. 3622-3631, 2011.

SIMSEK, I.. TNF inhibitors for rheumatoid arthritis – a year in review. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* v. 69, p. 220-224, 2011.

SINGH, D.; SINGH, B.; GOEL, R.K.. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus religiosa*: a review. *J Ethnopharmacol.* v. 134, p. 565-583, 2011.

SOEHNLEIN, O.; ZERNECKE, A.; WEBER, C.. Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. *Thromb Haemost.* v. 102, p. 198-205, 2009.

SÓRIA-CASTRO, I.; KRYZYZANOWSKA, A.; LOPEZ PELAEZ, M.; REGADERA, J.; FERRER, G.; MONTOLIU, L.; RODRIGUEZ-RAMOS, R.; FERNANDEZ, M.; ALEMANY, S.. COT/TPL2 (MAP3K8) mediates myeloperoxidase activity and hypernociception following peripheral inflammation. *J. Biol. Chem.* v. 285, p. 33.805-33.815, 2010.

STANDISH, A.J.; WEISER, J.N.. Human neutrophils kill *Streptococcus pneumoniae* via serine proteases. *J Immunol.* v. 183, p. 2602-2609, 2009.

STEEL, H.C.; ANDERSON., R.. Dissociation of the PAF-receptor from NADPH oxidase and adenylate cyclase in human neutrophils results in accelerated influx and delayed clearance of cytosolic calcium. *Br J Pharmacol.* v. 136, p. 81-89, 2002.

SU, W.H.; CHENG, M.H.; LEE, W.L.; TSOU, T.S.; CHANG, W.H.; CHEN, C.S.; WANG, P.H.. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for wounds: pain relief or excessive scar formation? *Mediators Inflamm.* 413238, 2010.

SZEKANECZ, Z.; KOCH, A.E.. Vascular involvement in rheumatic diseases: 'vascular rheumatology'. *Arthritis Res Ther.* v. 10, p. 224, 2008.

THEPEN, T.; HUHN, M.; MELMER, G.; TUR, M.K.; BARTH, S.. Fcγ receptor 1 (CD64), a target beyond cancer. *Curr Pharm Des.* v. 15, p. 2712-2718, 2009.

TINTINGER, G.R., THERON, A.J.; POTJO, M.; ANDERSON, R.. Reactive oxidants regulate membrane repolarization and store-operated uptake of calcium by formyl peptide-activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med.* v. 42, p. 1851-1857, 2007.

TINTINGER, G.R.; STEEL, H.C.; THERON, A.J.; ANDERSON, R.. Pharmacological control of neutrophil-

mediated inflammation: strategies targeting calcium handling by activated Polymorphonuclear leukocytes. *Drug Des Devel Ther.* v. 2, p. 95-104, 2009a.

TINTINGER, G.R.; STEEL, H.C.; THERON, A.J.; COCKERAN, R.; PRETORIUS, L.; ANDERSON, R.. Protein kinase C promotes restoration of calcium homeostasis to platelet activating factor-stimulated human neutrophils by inhibition of phospholipase C. *J Inflamm (Lond).* v. 6, p. 29, 2009b.

TOUSSIROT, E.; WENDLING, D.. The use of TNF-alpha blocking agents in rheumatoid arthritis: an update. *Expert. Opin. Pharmacother.* v. 8, p. 2089-2107, 2007.

TZANAVARI, T.; GIANNOGONAS, P.; KARALIS, K.P.. TNF-alpha and obesity. *Curr Dir Autoimmun.* v. 11, p. 145-156, 2010.

UNO, S.; IMAGAWA, A.; OKITA, K.; SAYAMA, K.; MORIWAKI, M.; IWAHASHI, H.; YAMAGATA, K.; TAMURA, S.; MATSUZAWA, Y.; HANAFUSA, T.; MIYAGAWA, J.; SHIMOMURA, I.. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produces tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia.* v. 50, p. 596-601, 2007.

VALÉRIO, M.; AWAD, A.B.. β -Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages. *Int Immunopharmacol.* v. 11, p. 1012-1017, 2011.

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M.. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* v. 27, p. 693-733, 2009.

VAN DER VEEN, B.S.; DE WINTHER, M.P.; HEERINGA, P.. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their

relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. v. 11, p. 2899-2937, 2009.

VIGIL S. V. G.; LIZ, R.; MEDEIROS, Y.; FRÖDE, T. S.. Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch. *Transpl. Immunol*. v. 19, p. 25-29, 2008.

VONK, A.G.; NETEA, M.G.; KULLBERG, B.J.. Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by murine polymorphonuclear neutrophils. *Methods Mol Biol*. v. 845, p. 277-287, 2012.

WALCZAK, H.. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Rev*. v. 244, p. 9-28, 2011.

WANG, Q.S.; CUI, Y.L.; DONG, T.J.; ZHANG, X.F.; LIN, K.M.. Ethanol extract from a Chinese herbal formula, “Zuojin Pill”, inhibit the expression of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages. *J Ethnopharmacol*. v. 141, p. 377-385, 2012.

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

WILLIAMS, M.R.; AZCUTIA, V.; NEWTON, G.; ALCAIDE, P.; LUSCINSKAS, F.W.. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol*. v. 32, p. 461-469, 2011.

WRIGHT, H.L.É MOOTS, R.J.É BUCKNALL, R.C.É EDWARDS, S.W.. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. v. 49, p. 1618-1631, 2010.

XIONG, L.; FANG, Z.Y.; TAO, X.N.; BAI, M; FENG.. Effect and mechanism of ligustrazine on T_H1/T_H2 cytokines in a rat asthma model. *Am J Chin Med.* v. 35, p. 1011-1020, 2007.

YAMASHITA, K.; TAKAHASHI, A.; KOBAYASHI, S.; HIRATA, H.; MESNER, P.W.; KAUFMANN, S.H.. et al. Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood* v. 93, p. 674–685, 1999.

YAN, F., WANG, L., SHI, Y., CAO, H., LIU, L., WASHINGTON, M.K., CHATURVEDI, R., ISRAEL, D.A., CAO, H., WANG, B., PEEK, R.M.Jr., WILSON, K.T., POLK, D.B.. Berberine promotes recovery of colitis and inhibits inflammatory responses in colonic macrophages and epithelial cells in DSS-treated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* v. 302, p. G504-514, 2012.

YANG, E.J.; LEE, J.S.; YUN, C.Y.; KIM, I.S.. The pro-apoptotic effect of hydroquinone in human neutrophils and eosinophils. *Toxicol In Vitro.* v. 25, p. 131-137, 2011.

YOUSEFI, S., MIHALACHE, C., KOZLOWSKI, E., SCHMID, I., SIMON, H.U.. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* v. 16, p. 1438-1444, 2009.

ZAMANI, B.; JAMALI, R.; JAMALI, A.. Serum adenosine deaminase may predict disease activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* v. 32, p. 1967-1975, 2012.

ZAMONER, A.; CORBELINI, P.F.; FUNCHAL, C.; MENEGAZ, D.; SILVA, F.R.; PESSOA-PUREUR, R.. Involvement of calcium-dependent mechanisms in T3-induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. *Life Sci.* v. 77, p. 3321-3335, 2005.

ZAMONER, A.; ROYER, C.; BARRETO, K.P.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in cerebral cortex from Young rats. *Neurosci Res* v. 57, p. 98-103, 2007.

ZAMONER, A.; PIEROZAN, P.; VIDAL, L.F.; LACERDA, B.A.; DOS SANTOS, N.G.; VANZIN, C.S.; PESSOA-PUREUR, R.. Vimentin phosphorylation as a target of cell signaling mechanisms induced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in immature rat testes. *Steroids*. v. 73, p. 1400-1408, 2008.

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

ZARROUK, W.; CARRASCO-PANCORBO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; ZARROUK, M.. Exploratory characterization of the unsaponifiable fraction of tunisian virgin olive oils by a global approach with HPLC-APCI-IT MS/MS analysis. *J. Agric. Food Chem.* v. 58, p. 6418-6426, 2010.

ZHANG, L.; PEPPEL, K.; SIVASHANMUGAM, P.; ORMAN, E.S.; BRIAN, L.; EXUM, S.T.; FREEDMAN, N.J.. Expression of tumor necrosis factor receptor-1 in arterial wall cells promotes atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* v. 27, p. 1087-1094, 2007.

ZHAO, W.C.; SONG, L.J.; DENG, H.Z.. Protective effect of total alkaloids of *Sophora alupecuroides* on dextran sulfate sodium-induced chronic colitis. *Chin J Integr Med.* v. 17, p. 616-624, 2011.

ZHAO, B.; CHEN, Y.; SUN, X.; ZHOU, M.; DING, J.; ZHAN, J.J.; GUO, L.J.. Phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum* rhizome protect against brain ischemia injury via regulation of

GLT-1, EAAC1 and ROS generation. *Molecules*. v. 17, p. 2725-2737, 2012.

ANEXOS

ANEXO 1

**Protocolo de aprovação na Comissão de Ética no Uso
de Animais (CEUA/UFSC) (PP00294/2009)**

Resultado de Solicitação de Protocolo**Protocolo**

PPO0294

TítuloESTUDO DO EFEITO E DO MECANISMO DE AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DA *Esenbeckia leiocarpe* EM MODELOS EXPERIMENTAIS IN VIVO E IN VITRO**Data de Entrada**

30/01/2009

Resultado:

Aprovado

Data/ Prazo

03/04/2009

Considerações

Ofício nº 028/CEUA/PRPe/2009

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

Ao(s): Prof(a) Dr(a) Tânia Silvia Frode - Departamento de Análises Clínicas - CCS

Prezado(s) Professor(a),

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

- APROVADO, por 4 (quatro) anos, para a utilização de 1652 camundongos (*Mus musculus*). VIDE parecer anexo.

- Processo cadastrado sob o número: 23080.004957/2009-24

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**Data 07/07/2012**

Data 07/04/2009

Parecer(es):

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

ANEXO 2**Resumos apresentados em anais de congressos**

LIZ, R.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; GIRARD, D.; FRODE, T. S.. *Esenbeckia leiocarpa* Engl. works as an agonist to human neutrophils and leads to atypical apoptosis: inability for increasing CD16 shedding and vimentin degradation. In: XXVII Reunião Annual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia, Brasil.

LIZ, R.; NADER, M.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; GIRARD, D.; FRODE, T. S.. Activation of human neutrophils by the crude hydroalcoholic extract and an alkaloid-enriched fraction from *Esenbeckia leiocarpa* Engl.. In: XXVII Reunião Annual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia, Brasil.

ARRUDA-SILVA, F.; ASTOLFI, G.; **LIZ, R.;** CÓRDOVA, C.M.M.; H.; FRODE, T. S.; DALMARCO, E.M.. Modulatory effect of mycophenolate mofetil on carrageenan-induced inflammation in the mouse air pouch model. In: XXVII Reunião Annual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia, Brasil.

FRÖDE, T.S.; **LIZ, R.;** ZANATTA, L.; REIS, G.O.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B.. Beta-sitosterol promotes an anti-inflammatory effect in murine activated neutrophils in a calcium uptake-dependent manner In: 2012 Annual Meeting - AACC, 2012, Los Angeles. American Association for Clinical Chemistry, 2012.

LIZ, R.; PEREIRA, D. F.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; FRODE, T. S.. Inhibition of pro-inflammatory mediators by systemic administration of *Esenbeckia leiocarpa* in the inflammation induced by carrageenan in the mouse air pouch

model. In: XXV Reunião Annual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2010, Águas de Lindóia, Brasil.

LIZ, R.; DALMARCO, E. M.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; FRODE, T. S.. Evaluation of the anti-inflammatory effect of *Esenbeckia leiocarpa* in the mouse air pouch model. In: XXI Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinaias, 2010, João Pessoa, Brasil.

LIZ, R.; DALMARCO, E. M.; PEREIRA, D. A.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; SIMIONATTO, E. L.; FRODE, T. S.. HPLC profile and anti-inflammatory effect of *Lotus corniculatus* V. São Gabriel crude extract, in a murine model of pleurisy. In: XXI Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinaias, 2010, João Pessoa, Brasil.

LIZ, R.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; FRODE, T. S.. Analysis of the anti-inflammatory effect of *Esenbeckia leiocarpa* in a murine air pouch model. In: XXIV Reunião Annual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2009, Águas de Lindóia, Brasil.

LIZ, R.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; FRODE, T. S.. Protected effect of *Esenbeckia leiocarpa* upon inflammatory response induced by carrageenan in the air pouch model, in mice. In: XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2009, Salvador, Brasil.

LIZ, R.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; FRODE, T. S.. Systemic administration of *Esenbeckia leiocarpa* inhibits the development of inflammation caused by carrageenan in the murine air pouch model. In: XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2009, Salvador, Brasil.

LIZ, R.; DALMARCO, E. M.; NEIVA, T. J. C.; MORITZ, M. I. G.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S.. Evaluation of the antimicrobial and antiplatelet aggregation properties of *Solidago*

chilensis Meyen.. In: XXIII Reunião Annual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2008, Águas de Lindóia, Brasil.



LIZ, R.; BENINCA, J. P.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; FRODE, T. S.. Anti-inflammatory activity of *Rosmarinus officinalis* L., in a murine model of pleurisy. In: XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2008, Ribeirão Preto, Brasil.

LIZ, R.; MORITZ, M. I. G.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S.. Analysis of anti-inflammatory effect of *Solidago chilensis* Meyen in a murine air pouch model. In: XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2008, Ribeirão Preto, Brasil.

ANEXO 3
Artigo 1 publicado



Protected effect of *Esenbeckia leiocarpa* upon the inflammatory response induced by carrageenan in a murine air pouch model

Rafael Liz^a, Danielle Fontana Pereira^b, Heros Horst^c, Eduardo Monguilhott Dalmarco^a, Juliana Bastos Dalmarco^c, Edésio Luiz Simionatto^d, Moacir Geraldo Pizzolatti^c, Denis Girard^e, Tânia Sílvia Fröde^a  

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

^b Department of Biochemistry, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário-Trindade, 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil

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

^d Department of Chemistry, Center of Natural Sciences, University of Blumenau, Campus Universitário, 89012-900, Blumenau, SC, Brazil

^e Laboratory of Inflammation and Physiology of Granulocytes, INRS – Armand Frappier Institut, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

Received 3 April 2011. Revised 9 August 2011. Accepted 16 August 2011. Available online 2 September 2011.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2011.08.009>, How to Cite or Link Using DOI

Cited by in Scopus (0)

 Permissions & Reprints

ANEXO 4
Artigo 2 publicado

Research Article

Activation of Human Neutrophils by the Anti-Inflammatory Mediator *Esenbeckia leiocarpa* Leads to Atypical Apoptosis

Rafael de Liz,^{1,2} Heros Horst,³ Moacir Geraldo Pizzolatti,³
Tania Silvia Fröde,² and Denis Girard¹

¹ Laboratoire de Recherche en Inflammation et Physiologie des Granulocytes, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Pénitents, Laval, QC, Canada H7V 1B7

² Department of Clinical Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

³ Department of Chemistry, Center of Physical and Mathematical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

Correspondence should be addressed to Denis Girard, denis.girard@iaf.inrs.ca

Received 22 December 2011; Revised 20 February 2012; Accepted 23 February 2012

Academic Editor: Elaine Hatanaka

Copyright © 2012 Rafael de Liz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Despite the fact that *Esenbeckia leiocarpa*, a Brazilian plant, possesses potential anti-inflammatory properties, its effect in neutrophils, key players in inflammation, has never been investigated. In this study, a crude hydroalcoholic extract (CHE) was used to evaluate the potential toxic or agonistic effect of *E. leiocarpa* in human neutrophils. At a nontoxic concentration of 500 µg/mL, CHE increased actin polymerization and cell signaling events, especially p38 MAPK. Its modulatory activity on neutrophil cell apoptosis was investigated by cytology and by flow cytometry and, although CHE increased the apoptotic rate (by cytology) and increased annexin-V binding, it did not, unexpectedly, increase CD16 shedding. CHE increased the degradation of the cytoskeletal proteins gelsolin and paxillin but, surprisingly, not of vimentin. The proapoptotic activity of CHE was reversed by a pan-caspase inhibitor but not by a p38 inhibitor. We conclude that CHE is a novel human neutrophil agonist that induces apoptosis by a caspase-dependent and p38-independent mechanism in an atypical fashion based on its lack of effect on CD16 shedding and vimentin degradation. Since the resolution of inflammation occurs by elimination of apoptotic neutrophils, the ability of CHE to induce neutrophil apoptosis correlates well with its anti-inflammatory properties, as previously reported.

ANEXO 5
Artigo 3 publicado

RESEARCH**Open Access**

Activation of human neutrophils by *Esenbeckia leiocarpa*: comparison between the crude hydroalcoholic extract (CHE) and an alkaloid (Alk) fraction

Rafael de Liz^{1,3}, Heros Horst², Moacir Geraldo Pizzolatti², Tânia Silvia Fröde³ and Denis Girard^{1,4*}

ANEXO 6
Artigo 4 aceito para publicação

Decision Letter (JPP-11-1111.R1)

From: jppeditor@qub.ac.uk

To: saleh@ccs.ufsc.br

CC:

Subject: Journal of Pharmacy and Pharmacology - Decision on Manuscript ID JPP-11-1111.R1 [email ref: DL-RW-1-a]

Body: @@date to be populated upon sending@@

Dear Prof. Frode:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Acute effect of beta-sitosterol on calcium uptake mediates anti-inflammatory effect in murine activated neutrophils." in its current form for publication in Journal of Pharmacy and Pharmacology.

Please note although the manuscript is accepted the files will now be checked to ensure that everything is ready for publication, and you may be contacted if final versions of files for publication are required.

If you have not done so already you should now supply your completed Copyright form, which can be located under "Instructions and Forms" on the submission site at <http://mc.manuscriptcentral.com/jppharm>.

Thank you for your fine contribution. I look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Prof. David Jones

Editor in Chief, Journal of Pharmacy and Pharmacology

jppeditor@qub.ac.uk

Editor-in-Chief Comments to Author: