



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA – PPGFAR**

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *Rosmarinus officinalis* L. UTILIZANDO O MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS**

**MESTRADO**

**Julia Salvan da Rosa**

**Florianópolis  
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA – PPGFAR**

Julia Salvan da Rosa

**ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *Rosmarinus officinalis* L. UTILIZANDO O MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde  
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco

Área de Concentração: Análises Clínicas.

Linha de Pesquisa: Mecanismos moleculares e celulares envolvidos em processos fisiopatológicos.

Florianópolis  
2013

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

Rosa, Julia Salvan

Estudo do efeito anti-inflamatório da *Rosmarinus officinalis* L. utilizando o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos [dissertação] / Julia Salvan da Rosa ; orientadora, Tânia Silvia Fröde - Florianópolis, SC, 2013.

117 p. ; 21cm

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

Inclui bibliografia

1. Farmácia. 2. Efeito anti-inflamatório. 3. *Rosmarinus officinalis* L.. 4. Pleurisia. 5. Produtos naturais. I. Fröde, Tânia Silvia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

*Dedico esta dissertação aos meus pais Valdemir e Varlei que, sempre me estimularam a dar este grande passo. Estas duas pessoas com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado, me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por tudo.*



## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente quero agradecer a DEUS, já que Ele nos deu o dom da vida e, além disso, colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!*

*Aos meus pais, Valdemir e Varlei, meu infinito agradecimento pelos momentos de plenitude e apoio familiar incondicional. Por sempre me incentivarem a alcançar caminhos cada vez mais distantes. A vocês, minha eterna gratidão!*

*As minhas irmãs, Sílvia e Cláudia, meu agradecimento especial, pois, sempre apoiaram e estiveram presentes em minha vida, por serem irmãs, amigas, parceiras e grande incentivadoras nesta caminhada. Obrigada por tudo sempre!*

*Aos meus “candidatos à” cunhados Felipe e Pedro, pelo incentivo e apoio. Obrigada pelo carinho!*

*À minha orientadora Profa. Dr. Tânia Sílvia Fröde, por todo empenho, sabedoria, compreensão, liberdade e confiança referente ao presente trabalho, além da indiscutível amizade e compreensão em momentos difíceis. Profa Tânia, meu muito obrigado!*

*Ao meu co-orientador Eduardo Monguilhott Dalmarco, por sua ajuda, interesse e amizade, além de sempre me incentivar na busca do crescimento, sendo exemplo de competência, garra e determinação.*

*Ao meu amigo e confidente, companheiro de laboratório e de mestrado, parceiro para todas às horas, Gustavo Oliveira dos Reis. Obrigada por todo apoio, por dividir as angústias, problemas e alegrias, por me ensinar muito do que sei hoje no laboratório, pelos momentos de descontração, risos, festas, alegrias, estresse e aprendizado. Obrigada sempre!*

*Ao meu amigo de parceiro de iniciação científica, Bruno Matheus Facchin, pelas horas de experimentos e conversas, e muitas conversas... Obrigada por tudo, sua ajuda foi fundamental!*

*Aos meus colegas de laboratório, alguns até que já saíram: Ziliani da Silva Buss, Patricia P. Wanzeller, Rafael de Liz, Marina Nader, Jucélia P. Benincá, Diana A. Pereira, Silvana Vigil de Mello, Geison Vicente, Fábio A. Silva, Renata Souza, Marcus Vinícius Nascimento, Rodrigo Mattei, Andrea T. C. Hoepers, Juliana K. Ikino, entre outros que participaram do Grupo de*

*Pesquisa em Imunologia Clínica, obrigada pelas horas boas e não tão boas que passamos juntos, por todo companheirismo e apoio. Em especial, gostaria de agradecer a Ziliani, por tudo que me ensinou, além de ser uma grande amiga, companheira, alguém que sabe escutar e sempre tem uma palavra amiga para ajudar.*

*Aos professores do departamento de Química: Moacir Geraldo Pizzolatti e Gustavo Micke, e seus alunos: Juliana Bastos Dalmarco e Mariana Araújo Siqueira, obrigada por realizar todas as análises fitoquímicas necessárias.*

*A professora Tânia C. Pasa e seu grupo de pesquisa, por fornecer toda sua estrutura laboratorial e apoio em alguns experimentos. Muito obrigada!*

*Aos amigos que fizeram parte de vários momentos em minha vida, ajudando e incentivando sempre! Obrigada!*

*À UFSC, ao PGFAR e a CAPES agradeço por possibilitar a realização do presente trabalho e por todos os meios colocados à disposição.*

*Por fim gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desta dissertação, uma importante fase na minha vida.*



## RESUMO

**Introdução:** *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), conhecida como alecrim, é uma planta nativa da região mediterrânea e atualmente é cultivada em várias partes do mundo, incluindo o Brasil. Esta planta é empregada na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias como a asma brônquica. Além disso, estudos têm demonstrado que esta planta possui atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, hipoglicemiante, hepatoprotetora, antiplaquetária, antinoceptiva e antiviral.

**Objetivos:** Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto sem óleo (EBSO), frações e compostos isolados de *R. officinalis* L., administrada por via intraperitoneal (i.p.), no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

**Metodologia:** As partes aéreas frescas de *R. officinalis* L. foram submetidos às técnicas de extração por arraste de vapor para retirada dos óleos essenciais e de maceração em etanol 96%, para obtenção do extrato bruto sem óleo (EBSO). Este extrato foi particionado com hexano, acetato de etila e etanol para obter as frações hexano (HEX), acetato de etila (AcOEt) e etanólica (EtOH) ambas sem óleos essenciais. Os compostos isolados, Carnosol (CAR) e Ácido rosmarínico (RA), foram isolados da fração AcOEt e EBSO, respectivamente. No protocolo para identificar e elucidar a estrutura dos compostos isolados desta planta foram utilizadas análises de eletroforese capilar, características físicas, infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ). Neste protocolo experimental foram utilizados camundongos albinos Swiss. A pleurisia foi induzida segundo metodologia descrita por SALEH *et al.*, 1996 e, foram avaliados os seguintes parâmetros inflamatórios no lavado da cavidade pleural: leucócitos, exsudação, atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-desaminase (ADA), e as concentrações de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_x$ ), interleucina-17A (IL-17A) e interleucina-10 (IL-10), além do RNAm para IL-17A e IL-10. Neste estudo, diferentes grupos de animais foram tratados com EBSO (10 - 100 mg/kg), HEX (10 - 50 mg/kg), EtOH (10 - 50 mg/kg), AcOEt (10 - 50 mg/kg), CAR (1 - 10 mg/kg) ou RA (2,5 - 10 mg/kg) administrados (i.p.) 0,5 h antes da carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.). Os parâmetros inflamatórios foram avaliados 4 h após. Para avaliar a exsudação, os animais foram tratados previamente com solução Azul de Evans (25 mg/kg, i.v.). Diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas pela análise dos testes de variância (ANOVA), e complementadas pelo

teste Dunnett e/ou teste *t* de *Student*. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. **Resultados:** EBSO (50 - 100 mg/kg), HEX (25 - 50 mg/kg), EtOH (50 mg/kg), AcOEt (25 - 50 mg/kg), CAR (2,5 - 10 mg/kg) e RA (5 - 10 mg/kg) inibiram: leucócitos, neutrófilos, mononucleares e exsudação ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, EBSO (50 mg/kg), HEX (25 mg/kg), EtOH (50 mg/kg), AcOEt (25 mg/kg), CAR (2,5 mg/kg) e RA (5 mg/kg) inibiram as atividades das enzimas MPO e ADA, as concentrações de NO<sub>x</sub>, as concentrações/RNA<sub>m</sub> para IL-17A, além de aumentar as concentrações/RNA<sub>m</sub> para IL-10 ( $p < 0,05$ ). **Conclusões:** Os resultados demonstraram que a *Rosmarinus officinalis* L. possui importante atividade anti-inflamatória isto devido principalmente à redução do influxo de leucócitos e da exsudação. Este efeito parece ser em parte mediado pela inibição da liberação e/ou produção de mediadores pró-inflamatórios (NO<sub>x</sub>, IL-17A) e aumento da liberação e/ou produção de mediadores anti-inflamatórios (IL-10), incluindo a modulação da expressão do RNA<sub>m</sub>. Ainda, o carnosol e o ácido rosmarínido, parecem ser, em parte, responsáveis pelo efeito anti-inflamatório apresentado pela *Rosmarinus officinalis* L.

**Palavras-chave:** *Rosmarinus officinalis* L., pleurisia, efeito anti-inflamatório, mieloperoxidase, adenosina-desaminase, óxido nítrico, IL-10, IL17A.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), known as rosemary, is a native plant from Mediterranean region, which is currently cultivated in many parts of the world, including Brazil. This plant is widely used in folk medicine to treat inflammatory diseases, such as bronchial asthma. Furthermore, studies have demonstrated that this plant has antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycemic, hepatoprotective, antiplatelet, antinociceptive and antiviral activities. **Objectives:** To evaluate the anti-inflammatory effect of the crude extract oil free (EBSO), fractions and isolated compounds from *R. officinalis* L., administered intraperitoneally (i.p.) in the carrageenan-induced murine model of pleurisy. **Methodology:** The fresh *R. officinalis* L. aerial parts were underwent extraction through the steam technique to remove the essential oils and maceration with ethanol 96%, to obtain the crude extract oil free (EBSO). This extract was partitioned with hexane, ethanol and ethyl acetate solutions to obtain the hexane (HEX), ethyl acetate (AcOEt) and ethanol (EtOH) fractions, both with essential oils free. The isolated compounds, carnosol (CAR) and rosmarinic acid (RA) were isolated from the AcOEt fraction and EBSO respectively. Analysis of capillary electrophoresis, physical characteristics, infrared, nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR) were used to identify and elucidate the structure of the isolated compounds present in the *R. officinalis* L. Swiss mice were used throughout the experiments. Pleurisy was induced according to the methodology described by SALEH et al., 1996 and, the following inflammatory parameters were evaluated in the fluid leakage of the pleural cavity: leukocytes, exudation, myeloperoxidase (MPO) and adenosine deaminase (ADA) activities, and the concentrations of nitrite/nitrate ( $\text{NO}_x$ ), interleukin-17A (IL-17A), and interleukin-10 (IL-10), and mRNA for IL-17A and for IL-10. In this study, different groups of animals were pretreated with EBSO (10 - 100 mg/kg), HEX (10 - 50 mg/kg), EtOH (10 - 50 mg/kg), AcOEt (10 - 50 mg/kg), CAR (1 - 10 mg/kg) or RA (2.5 - 10 mg/kg) administered (i.p.) 0.5 h before carrageenan (1%) which was administered by intrapleural route (i.pl.). The inflammatory parameters were evaluated after 4 h. To evaluate the

exudation, the animals were pretreated with Evans blue dye (25 mg/kg, i.v.). Statistical differences between groups were determined by analysis of variance test (ANOVA), and supplemented by test Dunnett and/or Student's t test.  $p < 0.05$  was considered significant. Results: EBSO (50 - 100 mg/kg), HEX (25 - 50 mg/kg), EtOH (50 mg/kg), AcOEt (25 - 50 mg/kg), CAR (2.5 - 10 mg/kg) and RA (5 - 10 mg/kg) inhibited leukocytes, neutrophils, mononuclears and exudation ( $p < 0.05$ ). Also, EBSO (50 mg/kg), HEX (25 mg/kg), EtOH (50 mg/kg), AcOEt (25 mg/kg), CAR (2.5 mg/kg) and RA (5 mg/kg) inhibited the MPO and ADA activities, concentrations of NO<sub>x</sub>, concentration/mRNA for IL-17A, and increased concentration/mRNA for IL-hj10 ( $p < 0.05$ ). **Conclusions:** The results demonstrated that the *Rosmarinus officinalis* L. has important anti-inflammatory activity mainly due to reduce the influx of leukocytes and exudation. This effect appears to be related to the reduction of release and/or production of pro-inflammatory mediators (NO<sub>x</sub>, IL17A) and increased release and/or production of anti-inflammatory mediators (IL-10), including modulation of mRNA expression. Also, the carnosol and rosmarinic acid appear to be partly responsible for the anti-inflammatory effect presented by *Rosmarinus officinalis* L.

**Keywords:** *Rosmarinus officinalis* L., pleurisy, anti-inflammatory effect, myeloperoxidase, adenosina-deaminase, nitric oxide, IL-10, IL17A.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Imagem da *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) ..... 24
- Figura 2- Via do ácido araquidônico e mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs). ..... 33
- Figura 3- Vias de sinalização genômica e não-genômica dos glicocorticoides em células T. .... 35
- Figura 4 - Diagrama da sequência de obtenção do extrato bruto sem óleo, frações, e compostos isolados das folhas da *Rosmarinus officinalis* L. .... 42
- Figura 5 - Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do extrato bruto sem óleo (EBSO) e da fração AcOEt das partes aéreas da *Rosmarinus officinalis* L. .... 43
- Figura 6 – Modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos..... 48
- Figura 7 - Determinação do carnosol (1) e ácido rosmarínico (2) no extrato bruto sem óleo (EBSO) da *R. officinalis* L. e nas frações: hexano (HEX) e acetato de etila (AcOEt). .... 58
- Figura 8 - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO) (10 - 100 mg/kg) obtidos da *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurial (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. .... 61
- Figura 9 - Efeito da fração etanólica (EtOH) (10 - 50 mg/kg) obtidos da *R. officinalis* L., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurial (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. .... 62

Figura 10 - Efeito da fração hexano (HEX) (10 - 50 mg/kg) obtidos da *R. officinalis* L., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. .... 63

Figura 11 - Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) (10 - 50 mg/kg) obtidos da *R. officinalis* L., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. .... 64

Figura 12 - Efeito do Carnosol (CAR) (1 - 10 mg/kg) obtidos da fração AcOEt da *R. officinalis* L., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. .... 65

Figura 13 - Efeito do Ácido Rosmarínico (RA) (2,5 - 10 mg/kg) obtidos do EBSO da *R. officinalis* L., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos. .... 66

Figura 14 - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO)..... 68

Figura 15 - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre a atividade da adenosina-deaminase (ADA). .... 69

Figura 16 - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleuraral (i.pl.) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NO<sub>x</sub>)..... 70

Figura 17 - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleuraral (i.pl.) sobre as concentrações de interleucina-17A (IL-17A)..... 72

Figura 18 - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleuraral (i.pl.) sobre as concentrações de interleucina-10 (IL-10). ..... 73

Figura 19 - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleuraral (i.pl.) sobre a transcrição do RNAm para a citocina interleucina-17A (IL-17A).75

Figura 20 - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (1%, i.pl.) sobre a transcrição do RNAm para a citocina interleucina-10 (IL-10)..... 76

Figura 21 - Resumo do efeito anti-inflamatório da *Rosmarinus officinalis* L. no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos..... 85



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Equações de regressão linear, intervalo e coeficiente de correlação para compostos isolados .....	44
Tabela 2 - Oligonucleotídeos (iniciadores) e condições utilizadas nas reações de RT-PCR. ....	56
Tabela 3 - Quantificação do carnosol e do ácido rosmarínico no extrato e frações (mg/g de extrato ou fração) obtidos da <i>Rosmarinus officinalis</i> L. por eletroforese capilar (200nm). ....	57
Tabela 4 - Melhores doses e tempo de tratamento prévio do Extrato bruto sem óleo, fração etanólica, fração hexano, fração acetato de etila, carnosol e ácido rosmarínico isolados da <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	67



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A <sub>1</sub>	Receptor A1 de adenosina
A <sub>2A</sub>	Receptor 2A de adenosina
A <sub>2B</sub>	Receptor 2B de adenosina
A <sub>3</sub>	Receptor A3 de adenosina
AcOEt	Fração acetato de etila
ADA	Adenosina-deaminase
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidal
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora-1
APC	Célula apresentadora de antígeno
BALB/c	Linhagem de camundongos Balb/c
Ca <sup>2+</sup>	Íons cálcio
CAR	Carnosol
CD	<i>Cluster of differentiation</i> = marcadores de diferenciação celular
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementar
CD4+	Proteína de superfície expressa em linfócitos T auxiliares
CD8+	Proteína de superfície expressa em linfócitos T citotóxicos
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Cg	Carragenina
Cl <sup>-</sup>	Íons cloreto
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
CV	Coeficiente de variação
DC	Célula dendrítica
CXCL1	Quimiocina ligante cisteína-X-cisteína-1
CXCL2	Quimiocina ligante cisteína-X-cisteína-2
CXCL5	Quimiocina ligante cisteína-X-cisteína-5
CXCL7	Quimiocina ligante cisteína-X-cisteína-7
DEPC	Dietilpirocarbonato
Dexa	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Enzima desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DTT	DL-diltireitol
EBSO	Extrato bruto sem óleo essencial
EC	Eletroforese capilar
ELISA	Enzimaimunoensaio
eNOS/NOS3	Óxido nítrico sintase constitutiva endotelial
e.p.m	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtBr	Brometo de etídio
EtOH	Fração etanólica
EUA	Estados Unidos da América
G-CSF	Fator estimulador de colonias granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GC	Glicocorticóide
GR	Receptor de glicocorticóide
GRE	Elementos responsivos aos glicocorticóides
H <sub>2</sub> O	Molécula de água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HEX	Fração hexano
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IBD	Doença intestinal inflamatória grave
i.p.	Via intraperitoneal
i.pl.	Via intrapleural
i.v.	Via intravenosa
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN- $\alpha$	Interferon alfa
IFN- $\beta$	Interferon beta
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-1Ra	Antagonista do receptor de interleucina-1
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
Indo	Indometacina
iNOS/NOS2	Óxido nítrico sintase induzida
I $\kappa$ B $\alpha$	Subunidade inibitoria do fator de transcrição nuclear NF-K $\beta$
IS	Padrão interno

JAK	Janus quinase
LES	Lupus eritematoso sistêmico
Linfócitos $T\gamma\delta$	Linfócitos T gama/delta
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeos
LQPN	Laboratório de Química de Produtos Naturais
MCP-1	proteína quimiotática de monócito-1
$Mg^{2+}$	Íons magnésio
Mgr	Receptor de membrana de glicocorticóides
MPO	Mieloperoxidase
N	Número
NaCl	Solução salina estéril
NaOH	Hidróxido de sódio
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Célula Natural Killer
nNOS/NOS1	Óxido nítrico sintase constitutiva neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOx	Metabólitos do óxido nítrico (nitrito/nitrato)
$NO_2^-$	Nitrito
$NO_3^-$	Nitrato
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVA	Ovalbumina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
$PGD_2$	Prostaglandina D2
$PGE_2$	Prostaglandina E2
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandina F2 alfa
$PGG_2$	Prostaglandina G2
$PGH_2$	Prostaglandina H2
$PGI_2$	Prostaglandina I2 ou prostaciclina
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso/volume
RA	Ácido rosmarínico
RMN $^{13}C$	Ressonância magnética nuclear de carbonos
RMN $^1H$	Ressonância magnética nuclear de prótons
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA	ácido ribonucléico

*R. officinalis* L.    *Rosmarinus officinalis* L.  
RT-PCR            Reação em cadeia da polimerase com  
transcrição reversa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1 PLANTAS MEDICINAIS .....	23
<b>1.1.1 Gênero Rosmarinus</b> .....	<b>24</b>
1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	25
1.3 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS .....	32
1.4 MODELOS DE INFLAMAÇÃO .....	35
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>41</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL .....	41
<b>3.1.1 Coleta do material vegetal</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1.2 Obtenção do extrato e das frações sem óleos essenciais de <i>R. officinalis</i> L.</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1.3 Isolamento dos compostos da <i>R. officinalis</i> L.</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1.4 Eletroforese capilar (EC) do extrato bruto e frações da <i>R. officinalis</i> L.</b> .....	<b>43</b>
3.1.4.1 Preparação dos padrões e soluções de amostra .....	43
3.2 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....	45
<b>3.2.1 Delineamento do estudo</b> .....	<b>45</b>
<b>3.2.2 Animais</b> .....	<b>45</b>
<b>3.2.3 Procedimento anestésico</b> .....	<b>45</b>
<b>3.2.4 Eutanásia dos animais</b> .....	<b>45</b>
3.3 PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS .....	45
3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	46
3.5 TÉCNICAS UTILIZADAS .....	48
<b>3.5.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos</b> .....	<b>48</b>
<b>3.5.2 Determinação da exsudação</b> .....	<b>49</b>
<b>3.5.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase</b> .....	<b>49</b>
<b>3.5.4 Determinação da atividade da adenosina-deaminase</b> .....	<b>50</b>
<b>3.5.5 Quantificação dos metabólitos do óxido nítrico</b> .....	<b>50</b>
<b>3.5.6 Determinação das concentrações de IL-17A e IL-10</b> .....	<b>51</b>
<b>3.5.7 Semi-quantificação da transcrição de RNAm para IL - 17A e IL-10</b> .....	<b>52</b>
3.6 FÁRMACOS E REAGENTES .....	54
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	55
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>

4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA .....	57
<b>4.1.1 Quantificação dos compostos isolados.....</b>	<b>57</b>
4.2 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Rosmarinus officinalis</i> L. SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO.....	59
4.3 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>Rosmarinus officinalis</i> L. SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE.....	67
4.4 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>Rosmarinus officinalis</i> L. SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA-DEAMINASE .....	68
4.5 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>Rosmarinus officinalis</i> L. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NITRITO/NITRATO).....	69
4.6 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>Rosmarinus officinalis</i> L. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE IL-17A E IL-10 .....	71
4.7 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>Rosmarinus officinalis</i> L. SOBRE A TRANSCRIÇÃO DO RNAm DAS CITOCINAS IL-17A E IL-10..	74
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO A - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFSC).....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO B - RESUMOS APRESENTADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS.....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO C - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO: “SYSTEMIC ADMINISTRATION OF <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> L. ATTENUATES THE INFLAMMATORY RESPONSE <i>IN VIVO</i>”, AO PERIÓDICO <i>JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY</i>.....</b>	<b>108</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PLANTAS MEDICINAIS

A pesquisa com plantas medicinais é crescente em todo o mundo (PETRONILHO et al., 2012; NEWMAN; CRAGG, 2012). Desde a antiguidade os produtos naturais têm sido amplamente utilizados como matérias-primas de medicamentos (GOSSLAU et al., 2011; MISHRA; TIWARI, 2011). Atualmente, a grande diversidade estrutural de compostos químicos e a elucidação do mecanismo de ação fazem com que os produtos naturais sejam uma importante fonte para a descoberta e o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (SAKLANI, KUTTY, 2008; LEE, 2010). Neste sentido, foram descritas 1940 novas estruturas químicas com atividade antitumoral, entre os anos de entre 1981 e 2010, sendo que 48,6% destas foram provenientes e/ou tiveram sua estrutura química baseada em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Na medicina tradicional, principalmente os extratos de plantas tem sido utilizados no tratamento de diversas doenças de caráter inflamatório, infeccioso, entre outros (PETRONILHO et al., 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 65% a 80% da população nos países em desenvolvimento dependem principalmente das plantas para os cuidados primários de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Desta forma, os produtos naturais têm sido matérias-primas para o desenvolvimento de novos medicamentos (HARVEY 2008). Entre os anos de 2005 a 2007, 13 produtos naturais ou medicamentos derivados destes produtos foram aprovados e, até o ano de 2010 já se totalizaram 19 medicamentos comercializados no mundo (BUTLER, 2008; MISHRA; TIWARI, 2011). Além disso, o uso de plantas medicinais gera lucros expressivos no mercado internacional, prova disto é que entre os anos de 2003 e 2004 a Europa Ocidental teve um lucro anual de 5 bilhões de dólares. Já na China, em 2005, as vendas de produtos naturais totalizaram 14 bilhões de dólares e, no Brasil, 160 milhões de dólares em 2007 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Os países latino-americanos possuem grande biodiversidade mundial. Dentre eles, o Brasil possui destaca-se por possuir aproximadamente 20 a 22% de todas as plantas e micro-organismos existentes, contando com mais de 56 mil espécies descritas, estão distribuídos pelo Brasil (CALIXTO, 2005; MELO; AMORIM; ALBUQUERQUE, 2009).

Ainda, nos últimos anos, diversos estudos têm investigado o potencial efeito de plantas com base no seu uso na medicina popular. Esse fato é motivado pelo interesse em medicamentos a base de plantas; a preocupação com os possíveis efeitos colaterais dos medicamentos alopáticos; e ainda o valor econômico agregado (TALHOUK et al., 2007).

### 1.1.1 Gênero *Rosmarinus*

A *Rosmarinus officinalis* L. (Figura 1), conhecida popularmente como Alecrim, pertence à família Lamiaceae, é originária da costa do mar Mediterrâneo e amplamente distribuída em diversos países do mundo, inclusive no Brasil (ALBUQUERQUE et al., 2007; BAKIREL et al., 2008, ABU-BASAL, 2010). É uma erva perene, com folhas lineares e estreitas, de coloração verde-escuro na parte superior e esbranquiçada na inferior e com inflorescências de coloração violeta (GONZÁLEZ-TRUJANO et al., 2007; ULBRICHT et al., 2010).



**Figura 1-** Imagem da *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim)

Fonte: <http://www.internatura.org/guias/plantas/romero.html> Acesso em: 28 nov 2012.

As folhas frescas e secas do alecrim são utilizadas frequentemente como conservantes e aromatizantes no processamento de alimentos (ULBRICHT et al., 2010). Além disso, na medicina popular, esta espécie é utilizada no tratamento de distúrbios menstruais, cólica, febre, dor, sedação, depressão, flatulência, problemas estomacais, intestinais, hepáticos e renais, e ainda pode ser utilizada como antiespasmódico e cardiotônico e, no tratamento de doenças respiratórias inflamatórias, tais como asma (ALBUQUERQUE et al., 2007; ULBRICHT et al., 2010).

Estudos fitoquímicos realizados com extratos de *Rosmarinus officinalis* L. resultaram no isolamento de vários constituintes químicos, tais como: diterpenos fenólicos (ácido carnósico e carnosol), éster do ácido cafeico (ácido rosmarínico), triterpenos (ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido betulínico), monoterpenos e flavonas (PETERSEN et al., 2009; NGO et al., 2011; KONTOGIANNI et al., 2013).

Estudos farmacológicos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que o extrato desta planta, bem como seus compostos isolados carnosol e ácido rosmarínico exercem atividade hipoglicemiante (BAKIREL et al., 2008), antidepressiva (MACHADO et al., 2009), hepatoprotetora (AMIN; HAMZA, 2005), neuroprotetora em células dopaminérgicas (PARK; SAPKOTA; KIM, 2010), antiherpético (NOLKEMPER et al., 2006), antinociceptiva (GONZÁLEZ-TRUJANO et al., 2007; TAKAKI et al., 2008), antiplaquetária (LEE et al., 2007), espasmolítica (VENTURA-MARTÍNEZ et al., 2011), anti-proliferativa em células humanas de câncer de ovário (TAI et al., 2012) e antioxidante (BAKIREL et al., 2008; IBARRA et al., 2010). Ainda, alguns estudos experimentais também tem demonstrado que esta planta possui importante efeito anti-inflamatório (ALTINIER et al., 2007; MENGONI et al., 2011; BENINCÁ et al., 2011).

Tendo em vista que o foco do trabalho foi estudar o possível papel da *Rosmarinus officinalis* L. na resposta inflamatória, um breve comentário sobre inflamação foi descrito.

## 1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um evento complexo que envolve o reconhecimento do agente ou estímulo lesivo, desencadeando uma cascata de eventos celulares e microvasculares que tem

como principal objetivo a remoção do tecido danificado e a formação de outros novos (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006; MEDZHITOV; HORNG, 2009). Nessa cascata, observa-se inicialmente uma resposta de fase aguda, que possui duração variável, na qual há uma vasodilatação local e aumento da permeabilidade microvascular, seguido pela adesão e infiltração de leucócitos e de células fagocíticas no local da lesão, apoptose celular e crescimento de novos tecidos e vasos ou fibrose (MEDZHITOV, 2008; MEDZHITOV; HORNG, 2009). A complexidade desta resposta depende de mecanismos que atuam em diferentes etapas, tais como as alterações na composição das células do sistema imune e na resposta das células aos estímulos inflamatórios, regulação das vias de sinalização e controle da expressão gênica (MEDZHITOV; HORNG, 2009).

A resposta inflamatória está relacionada com doenças de caráter agudo, diversas manifestações crônicas que incluem alterações metabólicas como diabetes, doenças auto-imunes, neurogênica e degenerativas (MEDZHITOV; HORNG, 2009).

Durante a inflamação vários mediadores estão envolvidos e são recrutados para o local da inflamação visando à eliminação de microorganismos e restos celulares. Dentre eles, podemos destacar os neutrófilos e as células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) (SOEHNLEIN; LINDBOM 2010).

Os neutrófilos são importantes células da resposta imune inata, sendo as primeiras células a serem recrutadas para os locais de lesão, inflamação ou infecção e são responsáveis, junto com os macrófagos, pela fagocitose e destruição do agente causador da inflamação pela liberação de quimiocinas e citocinas (MONTESEIRÍN 2009; KUMAR; SHARMA, 2010; HOSTETTER, 2012).

Estas células são produzidas na medula óssea e circulam pelo sangue durante algumas horas (aproximadamente 6-8 horas em humanos e, 11 horas em camundongos) (BORREGAARD, 2010; SADIK; KIM; LUSTER, 2011). A função protetora dos neutrófilos na defesa do hospedeiro está relacionada à capacidade de fagocitar e produzir importantes substâncias antimicrobianas, proteases e espécies reativas de oxigênio (EROs), contribuindo assim para ativar e regular a resposta imune inata e/ou adaptativa, bem como a homeostasia dos tecidos (KUMAR; SHARMA, 2010; SADIK; KIM; LUSTER, 2011;

GOUGEROT-POCIDALO, 2012). Os neutrófilos possuem três tipos de grânulos no seu citoplasma, e cada um contém proteínas específicas: grânulos primários (azurófilos), secundários (específicos) e grânulos terciários (gelatinase), além das vesículas secretórias. No interior dos grânulos primários, há enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos e dentre eles destacam-se a mieloperoxidase (MPO) (BORREGAARD, 2010; HOSTETTER, 2012).

A MPO é descrita como uma proteína com propriedades pró-inflamatórias expressa principalmente em neutrófilos e, em menor quantidade, em mononucleares (monócitos/macrófagos) (HAEGENS et al., 2009; VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009). A atividade desta enzima está associada com a atividade fagocítica dos neutrófilos, o que envolve a absorção de organismos patogênicos, a desgranulação, o que resulta na liberação de moléculas antimicrobianas e a morte do agente agressor (PAPAYANNOPOULOS; ZYCHLINSKY 2009). Durante o processo de fagocitose, no fagossoma dos neutrófilos, há ativação da enzima adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) que, juntamente com o influxo de íons favorecem a ativação da MPO (VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009; ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). A presença de oxigênio e do NADPH oxidase resultam na produção do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o qual é desmutado pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), resultando em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009; ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). Ainda, a MPO é liberada no fagossoma e cataliza a oxidação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e de íons cloreto ( $Cl^-$ ), formando ácido hipocloroso (HOCl) que possui atividades oxidantes e microbicidas (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010; PROKOPOWICZ et al, 2012). No entanto, a ativação contínua do sistema MPO- $H_2O_2$ -HOCl pode promover uma lesão tecidual, isto porque o HOCl é capaz de iniciar reações de oxidação em lipídeos, no ácido desoxirribonucleico (DNA) e em lipoproteínas (MALLE et al., 2007).

A MPO é considerada um marcador de leucócitos ativados (LAU; BALDUS, 2006) e, pode ser utilizada como marcador de neutrofilia em condições de inflamação e sepse (FAITH et al., 2008). Ainda, em algumas doenças auto-imunes de caráter inflamatório como artrite reumatóide, asma e lúpus eritematoso sistêmico (LES) observaram-se aumento da concentração de

MPO (EKMEKCI et al., 2004; TELLES et al., 2010; VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009).

Outro tipo celular importante no processo inflamatório, essencial para a resposta imune inata e/ou adaptativa a patógenos são os monócitos/macrófagos (AUFFRAY, SIEWEKE, GEISSMANN, 2009). Estas células têm três funções principais tais como, apresentação de antígenos, fagocitose e a imunomodulação. Os monócitos, após migrarem para o tecido, se diferenciam em macrófagos (AUFFRAY, SIEWEKE, GEISSMANN, 2009). E, estas células quando ativadas tem a capacidade de secretar citocinas como: interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon alfa ou beta (INF- $\alpha/\beta$ ), além de ativar a oxido nítrico sintase (NOS) liberando o óxido nítrico (NO) (DALE; BOXER; LILES, 2008). Deste modo, em doenças inflamatórias crônicas, tais como aterosclerose e retinopatias crônicas, há uma infiltração de monócitos/macrófagos (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006).

Outro marcador envolvido na resposta inflamatória é a adenosina-desaminase (ADA). A ADA é uma enzima que participa do metabolismo das purinas catalisando irreversivelmente a desaminação da desoxiadenosina e adenosina em desoxinosina e inosina, respectivamente (KRENKE; KORCZYŃSKI, 2010). Esta enzima possui papel importante na maturação e na ativação de monócitos e linfócitos, sendo, portanto, considerada um marcador de atividade das células mononucleares (HASKÓ et al., 2007; KRENKE; KORCZYŃSKI, 2010).

A adenosina é um nucleosídeo endógeno, que desempenha papel importante nos sistemas: cardíaco, renal, hepático e respiratório. Ainda, o efeito biológico apresentado por este nucleosídeo é dependente do tipo de receptor ao qual ele se liga (KUMAR; SHARMA, 2009). Já foram identificados quatro receptores para adenosina, sendo estes acoplados à proteína G: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (FREDHOLM et al., 2001; FREDHOLM et al., 2011). Baixas concentrações de adenosina promovem a ativação de receptores de alta afinidade pela adenosina, tais como A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> e, altas concentrações de adenosina estimulam a ativação do receptor de baixa afinidade, A<sub>2B</sub> (HASKÓ et al., 2007; HASKÓ et al., 2008; HASKÓ et al., 2009). A adenosina possui efeitos tanto pró- quanto anti-inflamatório. Desta forma, a interação da

adenosina no receptor  $A_{2B}$  pode promover efeito pró-inflamatório (RYZHOV et al., 2008; ANVARI et al.; 2010). Já interação da adenosina nos receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$  e  $A_3$  parece promover efeito anti-inflamatório (KIM et al., 2009; VARANI et al., 2010; GAZONI et al., 2010; IMPELLIZZERI et al., 2011). A conversão da adenosina endógena em inosina reduz a disponibilidade de adenosina biologicamente ativa, e desta forma, este nucleosídeo irá se ligar a receptores de alta afinidade, resultando em efeito anti-inflamatório (DESROSIERS et al., 2007).

Neste contexto, a atividade da ADA é importante na regulação das concentrações extracelulares de adenosina e, conseqüentemente, no controle da estimulação do receptor, desempenhando assim um papel central na modulação da resposta inflamatória em doenças pulmonares crônicas, artrite reumatóide, doenças inflamatórias intestinais e sepse (ANTONIOLI et al., 2012). Deste modo, estudos demonstraram que há um aumento na atividade desta enzima no soro de pacientes com asma crônica (SUN et al, 2005), artrite reumatóide (DELANO et al., 2005) e em tumores (NAKAMACHI et al, 2003).

Além das células (neutrófilos e mononucleares) e enzimas (MPO e ADA) que participam da resposta inflamatória, outros importantes mediadores também são liberados na inflamação.

Entre os principais mediadores pró-inflamatórios pode-se destacar o óxido nítrico (NO), que é uma espécie reativa volátil, liberado principalmente por células endoteliais e por macrófagos, que participa de diversos processos biológicos como a regulação do tônus vascular, inflamação, neurotransmissão e apoptose (NAGY et al., 2007; TRIPATHI et al., 2007). Este mediador é um importante vasodilatador, que participa da resposta imune inata e/ou específica (NAGY et al., 2007; TRIPATHI et al., 2007; WANG et al., 2010).

O NO é sintetizado por conversão oxidativa da L-arginina em L-citrulina pela família das NO sintases (NOS) (BOVE; VAN DER VLIET, 2006; THOMAS et al., 2008). Esta enzima apresenta três isoformas: duas formas constitutivas, neuronal (nNOS, NOS1) e endotelial (eNOS, NOS3) e, uma forma induzida, conhecida como iNOS ou NOS2, que é regulada por liberação de citocinas pró-inflamatórias, entre outros (STEWART; KATIAL, 2012). A iNOS pode ser induzida pelo TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-1 $\beta$ , vírus, bactérias, alérgenos e poluentes ambientais (STEWART; KATIAL, 2012).

Em doenças inflamatórias pulmonares tais como, asma brônquica e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), há um aumento nas concentrações de NO. Este efeito ocorre porque, em condições de homeostasia, o NO derivado das nNOS e eNOS promove efeito na dilatação dos vasos sanguíneos pulmonares e o relaxamento do músculo liso das vias aéreas. Já o excesso de NO derivado da iNOS (NOS2), induz a liberação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como o peroxinitrito, desempenhando assim um papel central na inflamação das vias aéreas e do parênquima pulmonar (SUGIURA; ICHINOSE, 2011; STEWART; KATIAL, 2012).

Assim como o NO, várias citocinas também participam da resposta inflamatória, como importantes mediadores (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). As citocinas são proteínas chave na comunicação entre células, que estão relacionadas a funções de crescimento, diferenciação e ativação celular, e desta forma, auxiliam na manutenção da homeostasia e determinam o tipo de resposta imune (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010; CHANG; DONG, 2011). Dentre as citocinas, destacam-se a interleucina-17A (IL-17A) e a interleucina-10 (IL10).

A família da IL-17 é composta por seis membros, IL-17A a IL-17F, onde todos contêm resíduos de cisteínas carboxi-terminal. A IL-17A é também referida apenas como IL-17, uma vez que esta citocina foi a primeira desta família a ser descrita (MIOSSEC; KOLLS, 2012). Deste modo, a IL-17 é uma citocina pró-inflamatória, que contribui na patogênese de várias doenças inflamatórias, auto-imunes e câncer (CUA; TATO, 2010; MIOSSEC; KOLLS, 2012). Esta citocina é liberada por células da resposta imune inata (neutrófilos, células epiteliais e natural killer (NK)) e adaptativa (linfócitos CD8+, T $\gamma$  $\delta$ , principalmente CD4+(T<sub>H</sub>17)) (BENGHIAT et al., 2009; CUA; TATO, 2010; MIOSSEC; KOLLS, 2012). A IL-17 contribui tanto para a resposta inflamatória aguda quanto crônica, uma vez que promove o recrutamento de neutrófilos e de monócitos para o local da inflamação. Isto ocorre porque esta citocina induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , além de fatores de crescimento hematopoiético (fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)) e quimiocinas (interleucina-8 (IL-8), quimiocina ligante cisteína-X-cisteína-1 (CXCL1), quimiocina ligante cisteína-X-cisteína-2



(CXCL2), quimiocina ligante cisteína-X-cisteína-5 (CXCL5), quimiocina ligante cisteína-X-cisteína-7 (CXCL7), proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1)) (BENGHIAT et al., 2009; NEMBRINI; MARSLAND; KOPF, 2009; MIOSSEC; KOLLS, 2012).

A liberação de IL-17 tem sido relatada em diversas doenças, incluindo, psoríase, espondilite anquilosante, doença de Crohn, colite ulcerativa, esclerose múltipla, artrite reumatóide, além de asma e DPOC, entre outras (WANG; LIU, 2008; BENGHIAT et al., 2009; CUA; TATO, 2010; MIOSSEC; KOLLS, 2012).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que inicialmente foi descrita como uma citocina liberada em resposta a estímulos de células T<sub>H</sub>2 ou Treg, porém sabe-se que atualmente esta citocina é expressa tanto em células do sistema imune inato, incluindo as células dendríticas (DC), macrófagos, mastócitos, natural killer (NK), eosinófilos e neutrófilos quanto células do sistema imunitário adaptativo, tais como células T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 e T<sub>H</sub>17, células Treg, CD8 + e células B (SARAIVA; O'GARRA, 2010; OUYANG et al., 2011). A IL-10 pode se ligar a dois tipos de receptores: IL-10R1 e IL-10R2 e, juntamente com complexos proteicos, janus quinase (JAK) e sinal transdutor e ativador de transcrição (STAT), ativar as vias de sinalização para promover seus efeitos biológicos. Esta modulação está relacionada à diminuição dos linfócitos T, principalmente pela inibição de células apresentadoras de antígeno (APC). Assim, há uma redução na expressão do complexo de histocompatibilidade classe II (MHC classe II), bem como de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86). Ainda, a IL-10 reduz a produção e a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, tais como a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e interleucina-12 (IL-12) e, desta forma, também medeia efeitos indiretos sobre o desenvolvimento e a diferenciação de linfócitos T. Esta citocina também está relacionada à inibição da diferenciação e maturação de células dendríticas (DCs) de origem monocitária. A IL-10 ainda pode induzir a diferenciação e a proliferação de linfócitos B, granulócitos e, queratinócitos, bem como, ativar as células natural killer (NK) e linfócitos citotóxicos T CD8+ (MOSSER; ZHANG, 2008; HOFMANN et al., 2012).

Uma das principais funções biológicas da IL-10 é inibir a resposta pró-inflamatória que ocorre na imunidade inata e

adaptativa, e assim, prevenir as lesões nos tecidos. Desta forma, a concentração da IL-10 está diminuída em doenças inflamatórias e auto-imunes tais como, psoríase, doença intestinal inflamatória grave (IBD), artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil e inflamação hepática (OUYANG et al., 2011; HOFMANN et al., 2012).

### 1.3 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são os medicamentos utilizados no tratamento de doenças inflamatórias, isto porque eles são eficazes no tratamento da dor, febre e edema que, surge como consequência da liberação de mediadores pró-inflamatórios (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007). Dentre estes mediadores podemos destacar as citocinas, leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), espécies reativas de oxigênio, entre outros (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007; RAO; KNAUS, 2008). Os AINEs exercem seu efeito anti-inflamatório agindo na via do ácido araquidônico inibindo a enzima ciclooxigenase (COX), e desta forma, impedem a síntese de eicosanoides e prostanóide (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007; RAO; KNAUS, 2008). O efeito dos AINEs na produção de prostaglandinas é também a principal causa da sua toxicidade, promovendo a alteração da função renal, risco de doenças cardiovasculares e problemas gastrointestinais (LAINE et al., 2006; MCGETTIGAN; HENRY, 2011).

Neste estudo, a indometacina foi utilizada como fármaco de referência anti-inflamatório não esteroidal, sendo ela classificada como um inibidor não seletivo da COX (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007). Na figura 2 é ilustrado a via do ácido araquidônico, bem como o mecanismo de ação anti-inflamatório dos AINEs.

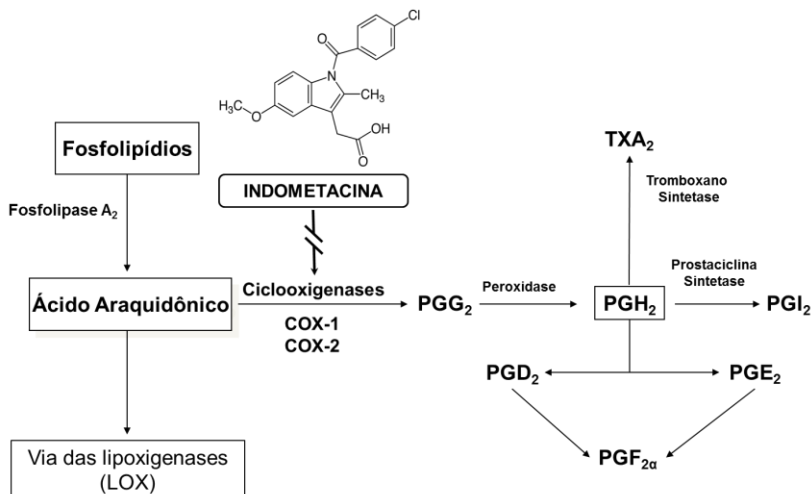


Figura 2- Via do ácido araquidônico e mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs).

Os AINEs atuam inibindo a enzima ciclooxigenase (COX) que catalisa a síntese de prostaglandinas. PGG<sub>2</sub> = prostaglandina G<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> = prostaglandina H<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> = prostaglandina I<sub>2</sub> ou prostaciclina, PGD<sub>2</sub> = prostaglandina D<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> = prostaglandina E<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> = prostaglandina F<sub>2</sub> alfa, TXA<sub>2</sub> = tromboxano A<sub>2</sub>.

Seta contínua (→) = conversão;

seta interrompida (—/—/—) = inibição.

Fonte: (Adaptado de DANNHARDT; KIEFER, 2001).

Além dos AINEs, os glicocorticóides são fármacos também utilizados como agentes anti-inflamatórios, atuando em vários tipos celulares e tecidos (FLAMMER; ROGATSKY, 2011). O mecanismo de ação desta classe de medicamentos pode ser classificado em genômico e não-genômico (BARNES, 2010; FLAMMER; ROGATSKY, 2011).

O seu efeito genômico ocorre por meio da ligação entre o glicocorticoide e um receptor específico presente na membrana citoplasmática, seguida da translocação do complexo glicocorticoide-receptor para o núcleo, onde o mesmo atua como um fator de transcrição, ligando-se a elementos responsivos aos glicocorticóides na região promotora de genes alvos e, assim modula a expressão gênica por meio da transrepressão ou transativação (BOLDIZSAR et al., 2010). A transrepressão gênica faz com que o complexo receptor-glicocorticoide formado

interfira na transcrição de genes alvo, tais como de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, IL-13, IL-15, TNF- $\alpha$ ), fatores de crescimento (GM-CSF, Fator de célula tronco (SCF)), moléculas de adesão (molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1)), óxido nítrico, autacoides, entre outros (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; BARNES, 2010). Entretanto, a transativação gênica promove a transcrição de genes de citocinas anti-inflamatórias, que incluem a IL-10 e a IL-12, além do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), da anexina 1, da proteína I kappa B-alfa (I $\kappa$ B- $\alpha$ ), entre outras (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; BARNES, 2010). Ainda, os glicocorticoides promovem efeitos não-genômicos, os quais são classificados em 4 mecanismos: 1) sinalização por meio de um receptor de membrana citoplasmática, 2) efeito direto na membrana citoplasmática, 3) interação entre o receptor de glicocorticoide e outras proteínas sinalizadoras no citoplasma celular e, 4) translocação do receptor de glicocorticoide para a mitocôndria (BOLDIZSAR et al., 2010). Neste estudo, utilizou-se a dexametasona como fármaco anti-inflamatório de referência como representante dos glicocorticoides. Na figura 3, está ilustrado o mecanismo de ação anti-inflamatório dos glicocorticoides.

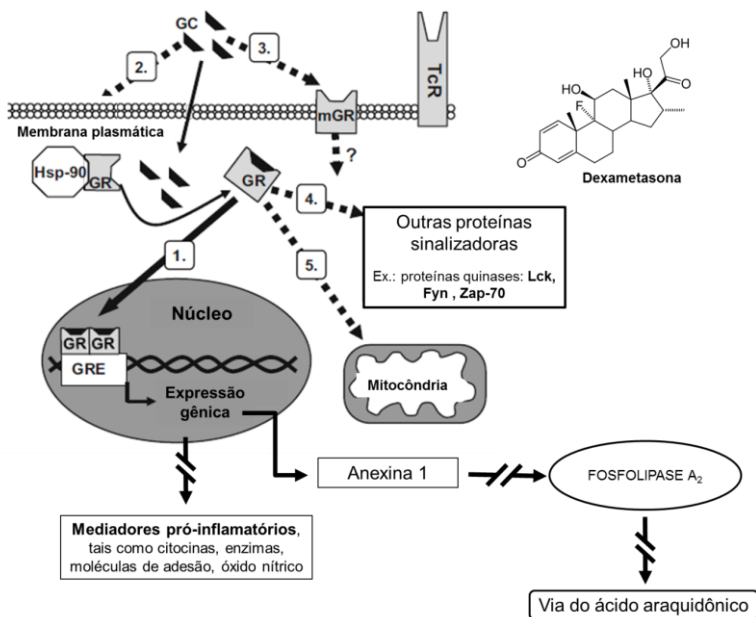


Figura 3- Vias de sinalização genômica e não-genômica dos glicocorticoides em células T.

1) via genômica clássica, demonstrando a transativação gênica da anexina 1, a qual inibe a enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, inibindo a via do ácido araquidônico, e a transrepressão gênica de mediadores pró-inflamatórios; 2) efeitos diretos na membrana; 3) sinalização por meio de um receptor de membrana (mGR); 4) interação do GR com proteínas sinalizadoras citoplasmáticas; 5) via mitocondrial. GC = glicocorticoide, GR = receptores de glicocorticoides, GRE = elementos responsivos aos glicocorticoides, TcR = receptor de células T.

Seta contínua (————→) = vias de sinalização genômica;

setas tracejadas (-----→) = vias de sinalização não-genômica;

seta interrompida (—//—→) = inibição.

Fonte: (Adaptado de BOLDIZSAR et al., 2010).

#### 1.4 MODELOS DE INFLAMAÇÃO

Para avaliar o efeito anti-inflamatório de fármacos e/ou plantas, diferentes modelos já foram descritos. Dentre eles pode-se destacar a pleurisia, a bolsa de ar, o edema de pata, a artrite

e o implante de esponjas embebidas em agentes irritantes (SEDGWICK; LEES, 1986).

Diversas doenças de caráter inflamatório promovem a formação do edema, infiltração de leucócitos e liberação de mediadores pró-inflamatórios. Dentre as doenças das vias aéreas que possuem uma resposta inflamatória conhecida, pode-se destacar a asma brônquica

Em modelos experimentais de asma, algumas espécies de animais têm sido utilizados, tais como cobaia, camundongos e ratos. Estes modelos experimentais permitem avaliar as alterações morfológicas, imunológicas e fisiológicas nas vias respiratórias que podem mimetizar alguns eventos que ocorrem na asma humana (LEWKOWICH; WILLS-KARP, 2008).

Dentre os modelos experimentais para indução de inflamação pulmonar, pode-se destacar o modelo de inflamação neutrofílica. E, nesta condição clínica, a resposta inflamatória pulmonar apresenta predomínio do influxo de neutrófilos (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Para isto, os modelos utilizados, destacam-se a indução de infecção pulmonar com *Pseudomonas aeruginosa* e o uso de lipopolissacarídeos (LPS) para estimular a resposta imune inata (HOFFMANN et al., 2005; DONG et al., 2009).

Outro modelo que também mimetiza a inflamação neutrofílica na cavidade pleural e no pulmão, é o da pleurisia que foi originalmente desenvolvido em ratos (SPECTOR, 1956) e mais tarde reproduzido em cobaias (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1989) e camundongos (HENRIQUES et al., 1990). A pleurisia induzida pela carragenina em camundongos é, portanto, um modelo que mimetiza a asma brônquica neutrofílica que ocorre em humanos, uma vez que neste modelo experimental evidencia-se uma resposta do tipo bifásica que também ocorre na asma humana.

A carragenina (Cg) é uma mistura de polissacarídeos derivados principalmente das algas *Chondrus crispus*, que possui o nome popular é musgo-irlandês (BRITO, 1989). Esta substância é o irritante mais utilizado para a indução de inflamação em estudos experimentais (BRITO, 1989). O modelo de inflamação induzida pela carragenina em camundongos é caracterizado por uma resposta inflamatória do tipo bifásica, em que na primeira fase (4 h) desta resposta ocorre o aumento da infiltração de leucócitos, principalmente neutrófilos, e da

exsudação, na cavidade pleural dos camundongos. E na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, observa-se também aumento da exsudação, bem como de células mononucleares (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1996). Este modelo possui vantagens em relação aos outros modelos citados anteriormente, pois, possibilita a avaliação do exsudato da cavidade pleural, bem como da migração celular e mediadores inflamatórios (HENRIQUES et al.,1990; SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1996).

Neste trabalho, optou-se pelo modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, utilizando-se apenas a primeira fase da resposta inflamatória que corre 4 h após a indução da inflamação na cavidade pleural pelo agente flogístico carragenina. A escolha deste modelo foi devido esta técnica ser padronizada em nosso laboratório, na facilidade de execução depois de adequado treinamento Além disso, é considerada um bom modelo para avaliar o mecanismo de ação de plantas que possuem propriedades anti-inflamatórias.





## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto sem óleo, frações e, compostos isolados obtidos das partes aéreas da *Rosmarinus officinalis* L., administrados sistemicamente, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar, caracterizar e quantificar por meio de metodologias analíticas os compostos isolados a partir do extrato bruto sem óleo e da fração acetato de etila de *Rosmarinus officinalis* L.
- b) Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto sem óleo de *Rosmarinus officinalis* L., frações e compostos isolados sobre a migração dos leucócitos (polimorfonucleares e mononucleares) e a exsudação, em camundongos.
- c) Investigar o efeito do extrato bruto sem óleo de *Rosmarinus officinalis* L., frações e compostos isolados sobre a atividade de enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA), em camundongos.
- d) Investigar o efeito do extrato bruto sem óleo de *Rosmarinus officinalis* L., frações e compostos isolados sobre as concentrações de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_x$ ), interleucina-17A (IL-17A) e interleucina-10 (IL-10), em camundongos.
- e) Investigar se o material vegetal é capaz de inibir/aumentar a expressão do RNAm para IL-17A e IL-10.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

##### 3.1.1 Coleta do material vegetal

As partes aéreas da *Rosmarinus officinalis* L. foram coletadas no município de Santo Amaro da Imperatriz, Santa Catarina, Brasil, e identificada pelo Dr. Daniel de Barcelos Falkenberg do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina. A exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC – Florianópolis/SC) sob o número de registro FLOR 34.918.

##### 3.1.2 Obtenção do extrato e das frações sem óleos essenciais de *R. officinalis* L.

As análises fitoquímicas foram realizadas pela Dra. Juliana Bastos Dalmarco, no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da UFSC, sob a orientação do professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti.

Setenta gramas das folhas frescas de *Rosmarinus officinalis* L. foram submetidas a hidro-destilação com 200 mL de água durante 4 h em um aparelho do tipo Clevenger modificado para extrair o óleo essencial. Após a retirada do óleo essencial, as folhas foram submetidas à maceração em etanol 96% durante uma semana à temperatura ambiente (22-25 °C) para obtenção do extrato bruto sem óleo. Depois deste período, o etanol foi removido por rotavapor (Fisatom-802, SP, SP, Brasil) a 55 °C, sob pressão reduzida (460 mm Hg) (Vacuum Q-355A2, Quimis, Diadema, SP, Brasil). Este procedimento rendeu 8,76 g de extrato bruto sem óleo essencial (EBSO). Parte do EBSO (3,26 g) foi submetido ao procedimento de filtração em coluna em gel de sílica (Vetec - 0,063-0,2 mesh) com os seguintes solventes hexano, acetato de etila e etanol para obter as frações hexano (HEX: 0,21 g, 6,4%), acetato de etila (AcOEt: 0,544 g, 16,7%) e

etanol (EtOH: 0,18 g, 5,5%). O produto derivado dos procedimentos de extração das folhas da *Rosmarinus officinalis* L. está ilustrado na figura 4.

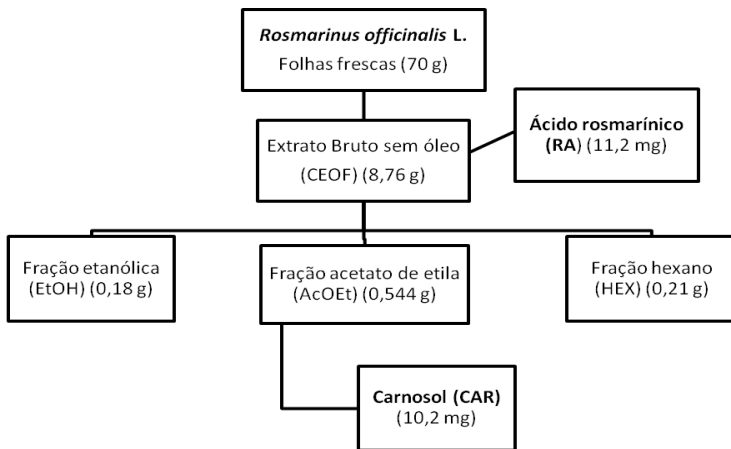


Figura 4 - Diagrama da sequência de obtenção do extrato bruto sem óleo, frações, e compostos isolados das folhas da *Rosmarinus officinalis* L.

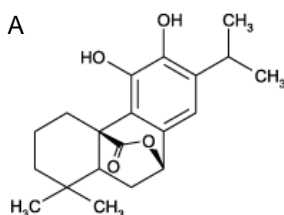
AcOEt = Fração acetato de etila, CAR = Carnosol, EBSO = Extrato bruto sem óleo, EtOH = Fração etanólica, HEX = Fração hexano, RA = Ácido rosmarínico.

### 3.1.3 Isolamento dos compostos da *R. officinalis* L.

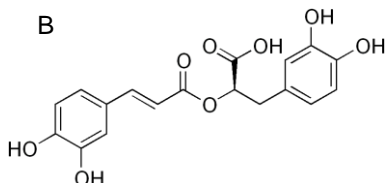
Parte da fração AcOEt (250 mg) foi dissolvida em metanol (10 mL) e submetido a Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando o equipamento Varian ProStar<sup>®</sup> 310 com um detector de UV/vis (210 nm) (Walnut Creek, CA, EUA), um injetor manual e, o software StarFinder<sup>®</sup> versão 5.5, para o isolamento e purificação do carnosol (Composto 1) (Figura 5A). Este procedimento está de acordo com a metodologia descrita por BENINCÁ et al. (2011), utilizando uma coluna semi-preparativa C8 (Beckman Ultrasphere Octyl 10 mm x 25 cm x 5 µm) (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). Este procedimento ainda originou 10,2 mg de um cristal incolor, que foi comparado a um padrão previamente obtido utilizando procedimentos

cromatográficos e, identificados por dados espectroscópicos de Ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ) (Varian AS-400 - Palo Alto, CA, EUA), e infra vermelho: IV (Perkin-Elmer FTIR PC 16, Beaconsfield, Inglaterra) (BENINCÁ et al., 2011).

Ao mesmo tempo, o EBSO (250 mg) foi dissolvido em metanol (10 mL) e alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram submetidos ao HPLC usando também uma coluna semi-preparativa C8 (Beckman Ultrasphere Octyl 10 mm x 25 cm x 5 m) (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). Na fase móvel foram utilizadas os seguintes solventes: metanol (A) e água (B) com uma taxa de fluxo de 2,0 mL/min. O perfil de eluição utilizado foi: 0-7,5 min 60:40 (A:B) (isocrático), para o isolamento do ácido rosmarínico (Composto 2) (Figura 5B). Após este procedimento, obteve-se 11,2 mg de um pó castanho amarelo claro, que foi comparado com o padrão comercial (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) por co-injeção, em espectroscopia de UV a 200 nm.



**Carnosol (CAR)**



**Ácido rosmarínico (RA)**

**Figura 5** - Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do extrato bruto sem óleo (EBSO) e da fração AcOEt das partes aéreas da *Rosmarinus officinalis* L.

(A) Composto 1 (carnosol) isolado a partir da fração de AcOEt e (B) Composto 2 (ácido rosmarínico) isolado a partir do EBSO.

### 3.1.4 Eletroforese capilar (EC) do extrato bruto e frações da *R. officinalis* L.

#### 3.1.4.1 Preparação dos padrões e soluções de amostra

As soluções estoque dos compostos 1 e 2 foram preparadas por meio da dissolução de 10 mg de ambos os compostos em 10 mL de metanol. O EBSO e as frações foram

diluídas em metanol a uma concentração final de 200 mg/mL. As soluções padrão, para a curva de regressão foram produzidos com cinco concentrações de diluições das soluções estoque iniciais (Tabela 1).

**Tabela 1** - Equações de regressão linear, intervalo e coeficiente de correlação para compostos isolados

<b>Analito</b>	<b>Equação de regressão</b>	<b>Coeficiente de correlação</b>	<b>Intervalo (µg/mL)</b>
CAR	$y = 0,021x - 0,168$	0,9970	22,8-228
RA	$y = 0,077x - 0,119$	0,9990	10-90

CAR: carnosol; RA: ácido rosmarínico.

### 3.1.4.2 Quantificação dos compostos isolados

Os experimentos envolvendo a separação dos compostos presentes no EBSO, HEX e AcOEt foram realizados em sistema de eletroforese capilar (HP<sup>3D</sup>CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). Em todos os experimentos, para a separação, foi utilizado um capilar de sílica fundida de 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo) x 50 µm ID x 375 µm OD (Polymicro, Phoenix, AZ, EUA). O capilar foi condicionado previamente por lavagem com 1 M de NaOH durante 30 min, seguido por lavagem de 30 min com água Milli-Q e 10 min com o tampão. Para as análises seguintes, o capilar foi lavado com 1 M de NaOH durante 2 min, seguido por uma lavagem de 2 min com água Milli-Q para assegurar boa repetibilidade. O capilar foi equilibrado com o tampão de corrida (20 mM tetraborato de sódio ajustado a pH 9,3) com 10% de metanol durante 3 min antes de cada injeção de amostra. Depois de cada análise, o capilar foi lavado durante 2 min com água Milli-Q. As amostras foram injetadas de maneira hidrodinâmica com pressão de 50 mBar durante 8 seg. Separações eletroforéticas foram realizadas a 25 kV, durante 5 min, e a temperatura foi mantida a 25 °C. Além disso, para a quantificação dos compostos (1 e 2), foi utilizado um padrão interno (IS) de 4-nitrofenol 20 mg L<sup>-1</sup>, e as curvas de calibração foram realizadas com as áreas dos picos dos padrões/área do padrão interno em função da concentração. Toda a análise neste

estudo foi realizada em 200 nm. Tanto os padrões quanto as amostras foram injetados em duplicata.

### 3.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

#### 3.2.1 Delineamento do estudo

Estudo experimental, prospectivo e controlado.

#### 3.2.2 Animais

Camundongos albinos *Swiss* ( $n = 600$ ), um mês de idade, fêmeas, pesando entre 18 e 25 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC, foram utilizados nos experimentos *in vivo*. Os animais mencionados receberam alimentação, bem como e água *ad libitum* durante todo o experimento, acomodados em gaiolas plásticas com serragem, sob temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 2$  °C) e luz natural. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA – protocolo número PP00632/CEUA/2011), e os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

#### 3.2.3 Procedimento anestésico

Neste protocolo experimental, a anestesia foi induzida com pentobarbital (60 mg/kg, i.p). A anestesia foi utilizada para a administração da solução de azul de Evans (25 mg/kg) administrado por via intravenosa (i.v.).

#### 3.2.4 Eutanásia dos animais

Os animais foram submetidos à morte indolor assistida com *overdose* de pentobarbital (180 mg/kg).

### 3.3 PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

A pleurisia foi induzida de acordo com os procedimentos descritos por SALEH, CALIXTO E MEDEIROS (1996).

No dia do experimento, os animais receberam 0,1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,95%) ou do agente flogístico carragenina (Cg, 1%), administrados na cavidade pleural direita através do espaço intercostal. Após 4 h, os animais foram sacrificados com overdose de pentobarbital, o tórax foi aberto e a cavidade pleural foi lavada com duas alíquotas de 0,5 mL (totalizando 1 mL) de solução salina tamponada [pH 7,6, NaCl (130 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 mM) e heparina (20 UI/mL)]. As amostras do lavado da cavidade pleural foram coletados para determinação de: leucócitos, exsudação, atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-desaminase (ADA), concentrações dos metabólitos do óxido nítrico (nitrito/nitrato) e citocinas (IL-17A e IL-10). Para a análise da expressão de RNAm para IL-17A e IL-10, foram analisadas amostras de tecido pulmonar.

Para a avaliação indireta da exsudação, os animais foram tratados com uma solução do corante azul de Evans (25 mg/Kg, 0,2 mL/animal), administrados por via endovenosa (i.v.) 10 min antes da indução da pleurisia (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Na análise da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA), bem como da concentração do nitrito/nitrato (NO<sub>x</sub>) e das citocinas: interleucina 17A (IL-17A) e interleucina 10 (IL-10), os animais não receberam a injeção com azul de Evans, uma vez que este corante pode interferir nas dosagens colorimétricas e enzimáticas empregadas para a quantificação desses parâmetros.

### 3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

De acordo com o protocolo experimental, para o estudo da curva dose-resposta, diferentes grupos de animais (n= 5, por grupo) foram tratados com diferentes doses de extrato bruto sem óleo (EBSO: 25-100 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 10-50 mg/kg), fração hexano (HEX: 10-50 mg/kg) e fração acetato de etila (AcOEt: 5-50 mg/kg), carnosol (CAR: 1-10 mg/kg) ou ácido rosmarínico (RA: 2,5-10 mg/kg) obtidos de *Rosmarinus officinalis* L., administrados por via intraperitoneal 0,5 h antes da indução da pleurisia com Cg (1%), administrada por via intrapleural (i.pl.). Após 4 h, os animais foram submetidos à morte indolor assistida e os parâmetros inflamatórios (leucócitos e as concentrações de

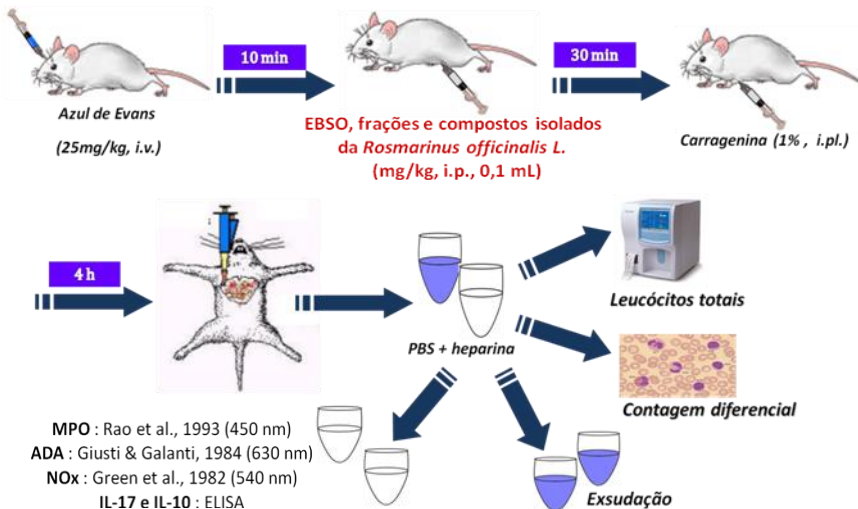


exsudação) foram analisados. Em relação aos solventes utilizados, o EBSO, frações e compostos isolados foram solubilizados em uma mistura de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) em solução salina (NaCl a 0,95%) (Figura 6).

Em um outro conjunto de experimentos, para avaliar o perfil temporal, diferentes grupos de animais receberam uma dose única de EBSO (50 mg/kg), EtOH (50 mg/kg), HEX (25 mg/kg), AcOEt (25 mg/kg), CAR (2,5 mg/kg) ou RA (5 mg/kg), ou seja a melhor dose (menor dose capaz de inibir o influxo de leucócitos e/ou exsudação) em diferentes períodos de tempo (0,5-2 h) antes da administração da carragenina e os mesmos parâmetros inflamatórios foram avaliados 4 h após a indução da pleurisia.

Com base nos resultados obtidos nos estudos das curvas dose-resposta e tempo-resposta, EBSO (50 mg/kg), EtOH (50 mg/kg), HEX (25 mg/kg), AcOEt (25 mg/kg), CAR (2,5 mg/kg) e RA (5 mg/kg), administrados 0,5 h antes da indução da carragenina foram utilizados para analisar os seus efeitos sobre a atividade das enzimas MPO e ADA, concentrações de  $\text{NO}_x$ , bem como concentrações/expressão do RNAm para interleucina-17A (IL-17A) e interleucina-10 (IL-10).

A dexametasona (0,5 mg/kg) e a indometacina (5 mg/kg), administradas por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da pleurisia, foram utilizadas como fármacos de referência de ação anti-inflamatória. Além disso, foram realizados em paralelo, um grupo de controle positivo (animais tratados apenas com Cg (1%), administrada por via intrapleural) e, um grupo de controle negativo (animais tratados apenas com solução salina estéril (NaCl, 0,9%), administrada por via intrapleural).



**Figura 6** – Modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

## 3.5 TÉCNICAS UTILIZADAS

### 3.5.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos

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

Para a contagem diferencial dos leucócitos, 50  $\mu\text{L}$  das alíquotas dos lavados da cavidade pleural foram centrifugados em citocentrífuga (Cytopro<sup>®</sup> cytocentrifuge Wescor, modelo: 7620 EUA) e os mesmos foram corados pelo método de MayGrünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão

(aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células x 10<sup>6</sup> (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

### **3.5.2 Determinação da exsudação**

A exsudação foi determinada pela avaliação indireta da concentração do corante azul de Evans, no exsudato pleural (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Assim, em cada grupo experimental, os animais foram tratados 0,5 h antes da carragenina com uma solução de corante azul de Evans (25 mg/kg), administrados por via intravenosa (i.v.), a fim de quantificar a exsudação na cavidade pleural.

No dia dos experimentos, uma alíquota (200 µL) do lavado da cavidade pleural foi coletado e mensurado por meio da densidade ótica em leitora de microplacas de enzimaímunensaio (ELISA) (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA), em 620 nm, de acordo com a metodologia descrita por SALEH, CALIXTO E MEDEIROS (1996). Para a quantificação da concentração de azul de Evans, curvas padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,01-50 µg/mL) tiveram suas densidades óticas determinadas, e formulou-se uma equação da reta ( $[ ] = (\text{abs} - 0,07374)/0,0573$ ), o que permitiu a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em µg/mL.

### **3.5.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase**

As amostras do lavado pleural foram coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais, para a quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), de acordo com a metodologia descrita por RAO et al, 1993. Alíquotas de 20 µL do lavado da cavidade pleural ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos (0,7-140 mU/mL)) foram transferidos para placas de enzimaímunensaio (ELISA) e a reação enzimática foi iniciada com a adição de 180 µL de solução (0,167 mg/mL de orto-dianisidina, 2HCl e 0,0005% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Após 15 minutos de incubação, a temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30 µL de azida sódica (1%) (RAO et al., 1993). Na etapa seguinte, as

placas contendo as amostras foram lidas em leitor de ELISA (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA), em 450 nm. Curvas-padrão com concentrações conhecidas da MPO (0,7-140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos em mU/mL, com o auxílio da equação da reta ( $MPO = (abs - 0,03014)/0,0009545$ ).

### **3.5.4 Determinação da atividade da adenosina-deaminase**

As amostras do lavado da cavidade pleural (10  $\mu$ L), contendo a enzima ADA, foram transferidas para cubetas iniciando-se a reação enzimática com a adição da solução de tampão fosfato [pH 6,5, 250  $\mu$ L, composição:  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  (35 mM),  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  (15 mM) e adenosina (0,5 mM)]. Após um período de incubação de 1 h a 37 °C, a reação foi bloqueada pela adição da solução (500  $\mu$ L) de fenol (1 mM), nitroprussiato de sódio (0,17 mM) e tampão alcalino (500  $\mu$ L: NaOCl: 11 mM e NaOH: 125 mM) (GIUSTI; GALANTI, 1984).

Além disso, foi utilizada uma solução padrão de sulfato de amônio com concentração conhecida, e de composição:  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  (35 mM),  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  (15 mM) e  $(NH_4)_2SO_4$  (15 mM). A avaliação da atividade da ADA no lavado pleural foi analisada pela geração de amônia ocasionada pela quebra da adenosina que foi adicionada ao meio. A amônia gerada reage com o fenol e o hipoclorito, reação dependente de pH alcalino e catalisada pelo nitroprussiato de sódio, favorecendo a formação de um indofenol de coloração azul. A concentração de amônia é proporcional à concentração de indofenol produzido. As absorbâncias das amostras e dos padrões foram mensuradas em leitora de ELISA (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA) em 620 nm (GIUSTI; GALANTI, 1984). Os valores da concentração de adenosina-deaminase (ADA) foram expressos em U/L.

### **3.5.5 Quantificação dos metabólitos do óxido nítrico**

O óxido nítrico (NO) foi indiretamente quantificado, no lavado pleural, pela formação de seus metabólitos nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ), utilizando a reação de Griess (GREEN et al, 1982). Para esta análise, no dia dos experimentos, 300  $\mu$ L de cada

amostra do lavado pleural foi submetida à desproteinização. Em cada amostra, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de solução de sulfato de zinco (20%), sob agitação em vórtex e incubadas em banho de gelo por 60 minutos. As amostras foram centrifugadas (2.500 rpm por 15 minutos) obtendo-se, desta forma, um sobrenadante límpido. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra foi transferido para um poço de microplaca de ELISA e diluídos em solução contendo 100  $\mu\text{L}$  de solução saturada de cloreto de vanádio (0,8%) (p/v) e ácido clorídrico (HCl) (3%) (p/v) e, 100  $\mu\text{L}$  de solução de Griess: sulfanilamida (1%) (p/v), ácido fosfórico (5%) (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v)). A mistura foi incubada por 40 minutos, a 37 °C (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). Nesta reação o cloreto de vanádio converte o  $\text{NO}_3^-$  em  $\text{NO}_2^-$  e com a adição do reagente de Griess se produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades óticas em leitor de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA) em 540 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de  $\text{NO}_2^-$  (0-150  $\mu\text{M}$ ) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato no exsudato da cavidade pleural, em  $\mu\text{M}$ , com auxílio da equação da reta ( $\text{NO}_x = (\text{abs} - 0,1306)/0,01142$ ).

### **3.5.6 Determinação das concentrações de IL-17A e IL-10**

Para a análise das concentrações de IL-17A e IL-10, imediatamente após a eutanásia dos animais, alíquotas do lavado da cavidade pleural foram coletadas e processadas para quantificar as citocinas. Neste protocolo, kits comerciais disponíveis foram utilizados com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina. As concentrações das citocinas foram mensuradas utilizando-se a técnica de ELISA tipo sanduíche, realizados de acordo com as instruções do fabricante.

As sensibilidades identificadas nos kits foram: IL-17A= 4,0 pg/mL e IL-10= 30 pg/mL. Os coeficientes de variação (CV) intraensaios para IL-17A e IL-10 foram de  $7,5\% \pm 1,7\%$  e  $4,9 \pm 3,7\%$ , respectivamente. Enquanto os CV interensaios para IL-17A e IL-10 foram de  $6,2\% \pm 0,9\%$  e  $8,8 \pm 6,1\%$ , respectivamente. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de cada citocina, IL-17A (4,0 - 500 pg/mL) e IL-10 (30 -

4000 pg/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo-se a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta (IL-17 =  $(\text{abs} - 0,34915)/0,00037$  e IL-10 =  $(\text{abs} - 0,08982)/0,00012$ ). As leituras de todas as citocinas e suas respectivas curvas-padrão foram estimadas por meio da medida colorimétrica em 450 nm, realizadas em leitor de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA). Os valores foram expressos em pg/mL.

### **3.5.7 Semi-quantificação da transcrição de RNAm para IL - 17A e IL-10**

A transcrição do RNAm para a interleucina-17A (IL-17A) e a interleucina-10 (IL-10) foi analisada no tecido pulmonar dos camundongos.

#### **3.5.7.1 Extração e quantificação do RNA de tecido pulmonar de camundongos**

Primeiramente, para a extração do RNA total, 200 mg de tecido pulmonar foram inseridos em tubos do tipo eppendorf (2 mL) que continham 1 mL de Brazol<sup>®</sup> e, a seguir, este tecido foi imediatamente picotado com auxílio de aparato cirúrgico livre de RNAses. O material obtido foi homogenizado em vórtex por cerca de 30 seg e incubado a temperatura ambiente (25 °C) por 5 min. Após o período de incubação foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, e o material foi novamente homogenizado e incubado por mais 3 min, a temperatura ambiente (25 °C). Após esta fase, o material foi centrifugado a 12.000 x g (4 °C) por 15 min, e a fase superior (fase aquosa) foi transferida para um tubo eppendorf. A este novo tubo adicionou-se 0,5 mL de isopropanol e incubou-se o material por 10 min, a temperatura ambiente (25 °C). Ao final desta etapa, o material foi novamente centrifugado por 10 min a 12.000 x g (4 °C), e o RNA total presente no sedimento foi recuperado (DALMARCO et al., 2012). Deste modo, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol (70%, v/v). Finalmente, realizou-se a centrifugação do material a 7.500 x g (4 °C) por 5 min e descartou-se o sobrenadante com posterior secagem do material em estufa (40 °C) por 10 min. Em seguida, foi adicionado ao sedimento 100 µL de água livre de RNAses (0,01% DEPC, v/v)

(DALMARCO et al., 2012). No final do processo de extração, a determinação da concentração e da pureza do RNA total, foram conferidas por leitura espectrofotométrica a 260 nm e pela razão da absorbância 260/280 nm respectivamente, com auxílio do aparelho picodrop™ (Hinxton, Cambridgeshire, Inglaterra).

### 3.5.7.2 Reação de transcrição reversa (RT)

Para eliminar a contaminação com DNA genômico, as amostras de RNA total foram tratadas com DNase I®, segundo instruções do fabricante (Fermentas®, Burlington, Ontario, Canadá). A seguir, 500 ng de cada amostra foi transferida para microtubos (200 µL) e, adicionou-se 50 µM de oligonucleotídeo (Oligo dT 12-18)®, 10 mM de dNTPs e 6 µL de água DEPC (0,01%). Estas amostras foram homogenizadas e incubadas por 5 min a 65°C e, posteriormente, acondicionados em banho de gelo por 2 min (DALMARCO et al., 2012).

Na próxima etapa, foram adicionados aos microtubos, 4 µL de solução tampão (First Strand Buffer 5x), 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de enzima inibidora de RNases (Ribolock® 20 U) e 1 µL da enzima Superscript III® (200 U), totalizando 20 µL de volume final. Estes microtubos foram agitados em vórtex e incubados por 1 h a 60 °C. Finalizada a incubação, os microtubos que agora continham o DNA complementar (cDNA), foram novamente incubados por 15 min a 70 °C, visando inativar as enzimas adicionadas anteriormente. Após este período, os microtubos foram armazenados em freezer (-20 °C) para posterior análise das amostras, por reações de PCR (DALMARCO et al., 2012).

### 3.5.7.3 Reação em cadeira da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas utilizando 2 µL de cDNA (obtidos da RT), 1 µM de cada oligonucleotídeo: senso e antisenso correspondentes a cada gene estudado (Tabela 1), 0,2 mM de dNTPs, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5 mM de tampão (10x PCR Buffer livre de Mg<sup>++</sup>), obtendo-se um volume final de reação de 25 µL. A reação de PCR ocorreu em quatro etapas: 1) Desnaturação do cDNA, incubando as amostras a 95 °C durante 5 min; 2) 35 a 40 ciclos de amplificação (45 seg. a 95 °C, 45 seg. na temperatura específica de cada oligonucleotídeos e 45 seg. a 72 °C) (Tabela 2); 3) etapa

de extensão, pelo qual a incubação foi de 72 °C por 7 min; 4) incubação a 4 °C por tempo indeterminado. A seqüência dos iniciadores específicos para cada gene foi definida com base no programa Primer 3 (versão 0.4.0), visando amplificar uma região gênica única (Tabela 2) (DALMARCO et al., 2012).

Iniciadores que amplificam o gene da  $\beta$ -actina de expressão constitutiva foram utilizados como controle positivo de amplificação gênica. Além disso, para excluir a possibilidade de contaminação, controles negativos contendo somente água como amostra foram realizados.

Terminadas as reações de PCR, 8  $\mu$ L de cada amostra correspondente aos grupos estudados foram misturados a 2  $\mu$ L de tampão de corrida (*Gel loading buffer* 6x) e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,0% contendo brometo de etídio (EtBr, 0,5  $\mu$ g/ml). A leitura do gel de agarose foi realizada com o auxílio de aparelho transiluminador de luz ultravioleta (Vilber Lourmat<sup>®</sup>, Capt Foto-System) (Marne-la-Vallée, Paris, França). A quantidade relativa do produto de RT-PCR para IL-17A e IL-10 foram determinadas por fotografia digital e a análise da densitometria dos géis de agarose corado com EtBr, normalizados com o controle interno ( $\beta$ -actina), utilizando uma versão imagem foto-Capt 12,4 para Windows<sup>®</sup>.

### 3.6 FÁRMACOS E REAGENTES

Neste estudo, foram utilizados os seguintes reagentes e fármacos: dexametasona (Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil), pentobarbital (Hypnol<sup>®</sup>, Cristália, São Paulo, SP, Brasil), carragenina- $\lambda$  (grau IV), hidróxido de sódio (NaOH), mieloperoxidase de neutrófilos humanos, indometacina, o-dianisidina 2HCl (3,3'-dimetoxibenzidina), azida sódica, cloreto de vanádio (III) (VCl<sub>3</sub>), sulfanilamida (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %) (Biotech, São Paulo, SP, Brasil), adenosina (C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>) (Fluka, Ronkonkoma, Nova York, EUA), heparina (Liquemine<sup>®</sup>, Roche, São Paulo, SP, Brasil), fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O), sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH), fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O) (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), nitroprussiato (C<sub>5</sub>FeN<sub>5</sub>Na<sub>2</sub>O.2H<sub>2</sub>O) (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil), sulfato de amônio (NH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>) (Labsynth,



São Paulo, SP, Brasil), HCl, etanol PA, acetato de etila PA, hexano PA (Synth, Diadema, SP, Brasil), líquido de Türk, May-Grünwald (Newprov, Pinhais, PR, Brasil), Giemsa (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), Azul de Evans ( $C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$ ) (Acros-Organics, Geel, Antwerp, Bélgica); Dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina ( $C_{12}H_{16}Cl_2N_2$ ) (Merck, Frankfurter, Darmstadt, Alemanha). Neste protocolo foram utilizados ainda, kits de enzima-imunoensaio (ELISA) para quantificação de IL-17A e IL-10 para camundongos (eBioscience Inc., Sao Diego, CA, EUA). Iniciadores para a reação de cadeia da polimerase (PCR) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), agarose (Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz, Madri, Espanha), Brazol<sup>®</sup>, brometo de etidio (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), Superscript III<sup>®</sup>, Oligo-dT (12-18)<sup>®</sup>, dNTPs e DNase grade I<sup>®</sup>, RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit e Ribolock<sup>®</sup> (Fermentas, Burlington, Canada). Outros sais e reagentes, de grau de pureza analítica, foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados, incluindo migração celular, exsudação, atividade das enzimas: MPO e ADA, bem como concentrações de nitrito e nitrato ( $NO_x$ ), IL-17A e IL-10, e a expressão do RNAm para as mesmas citocinas, foram expressos por média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) e valores percentuais. As diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e grupos tratados com o material vegetal ou com os fármacos de referência (Dexa ou Indo) foram realizadas por meio do teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) bicaudal, complementado, quando necessário, pelo teste *post hoc* de Dunnett ou do teste *t* de *Student* (não-pareado). Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 3.00 (San Diego, Califórnia, EUA). Para todas as análises estatísticas, valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

**Tabela 2** - Oligonucleotídeos (iniciadores) e condições utilizadas nas reações de RT-PCR.

Gene	Iniciadores	Produto de amplificação (pb)	Ciclos de amplificação	Temp. (°C) de desnaturação	Temp. (°C) de hibridização	Temp. (°C) de extensão	Registro no Genbank
β-actina	CCAACCGTGAAA	606	30	95	52	72	BC13861 4.1
	AGATGACC						
	GCAGTAATCTCC						
	TTCTGCATCC						
IL-17A	TCTCTGATGCTG	195	35	95	56	72	BC11930 9.1
	TTGCTGCT						
	CGTGGAACGGTT						
	GAGGTAGT						
IL-10	GGTTGCCAAGCC	191	40	95	58	72	NC00006 7.6
	TTATCGGA						
	ACCTGCTCCACT						
	GCCTTGCT						

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

#### 4.1.1 Quantificação dos compostos isolados

Para quantificar os compostos isolados no EBSO e nas frações HEX, AcOEt e EtOH, foram preparadas duas curvas de calibração interna, uma para o ácido rosmarínico (Sigma-Aldrich) e outra para o carnosol (previamente isolado) (BENINCÁ et al., 2011). As equações de regressão linear, o intervalo, e o coeficiente de correlação linear foram mostrados na Tabela 1. Os eletroferogramas do EBSO e das frações HEX e AcOEt obtidos de *Rosmarinus officinalis* L. são mostrados na figura 6 e foram obtidos utilizando a análise de eletroforese capilar. O carnosol (1), foi encontrado no EBSO (Figura 7A) e nas frações HEX (Figura 7B) e AcOEt (Figura 7C). Além disso, o ácido rosmarínico (2) foi encontrada no EBSO (Figura 7A).

Neste estudo, a fração EtOH não apresentou qualquer um dos compostos isolados (ácido rosmarínico e carnosol) (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantificação do carnosol e do ácido rosmarínico no extrato e frações (mg/g de extrato ou fração) obtidos da *Rosmarinus officinalis* L. por eletroforese capilar (200nm).

	[conc. de CAR em mg/g de extrato]	CAR (% m/m)	*RSD%	[conc. de RA em mg/g de extrato]	*RSD%	RA (% m/m)
EBSO	187,3	18,73	5,67	62,95	10,84	6,30
HEX	180,25	18,02	10,89	nd	-	-
AcOEt	193,27	19,30	7,59	nd	-	-
EtOH	nd	-	-	nd	-	-

\* RSD: Desvio padrão relativo; CAR: carnosol; RA: ácido rosmarínico; EBSO: extrato bruto sem óleo da *Rosmarinus officinalis* L.; HEX: fração Hexano; AcOEt: fração acetato; EtOH; fração etanólica; nd: não detectado.

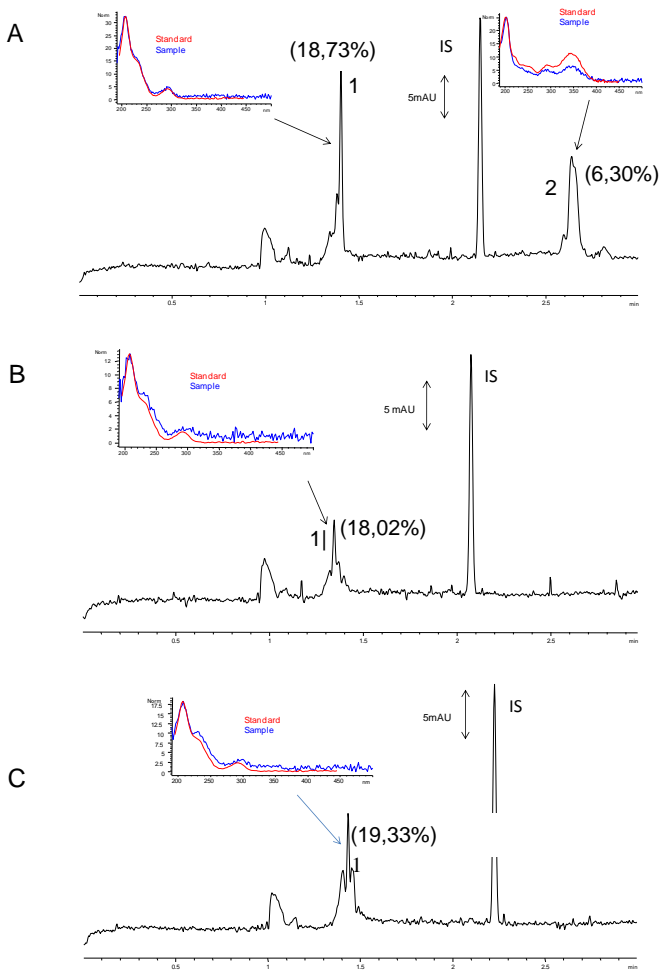


Figura 7 - Determinação do carnosol (1) e ácido rosmarinico (2) no extrato bruto sem óleo (EBSO) da *R. officinalis* L. e nas frações: hexano (HEX) e acetato de etila (AcOEt).

O carnosol (1), foi observado no extrato bruto (A), nas frações hexano (B) e acetato de etila (C). O ácido rosmarinico (2) foi determinado somente no extrato bruto sem óleo (A).

Eletoferograma de uma mistura padrão de compostos (1 e 2) e padrão interno (IS) de 4-nitrofenol 20 mg L<sup>-1</sup>. Sistema de eletrolítico composto de 20 mM tetraborato de sódio (ajustada para pH 9,3) com 10% de metanol. Outras condições: injeção hidrodinâmica (50 mbar, 8 s), tensão aplicada: 25 kV, temperatura: 25 °C; detecção direta em 200 nm.

## 4.2 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO

Na inflamação causada pela carragenina, o extrato bruto sem óleo obtido das partes aéreas da *Rosmarinus officinalis* (EBSO: 50 e 100 mg/kg) diminuiu significativamente a migração de leucócitos, os neutrófilos, os mononucleares e a exsudação ( $p < 0,01$ ) (Figura 8). Na dose de 25 mg/kg, o EBSO somente inibiu a migração de células mononucleares ( $p < 0,05$ ) (Figura 8C). Além disso, este extrato na dose de 10 mg/kg não modificou estes parâmetros inflamatórios estudados ( $p > 0,05$ ) (Figura 8).

Na fração etanólica (EtOH), somente a dose de 50 mg/kg foi capaz de causar uma inibição significativa sobre a migração leucocitária, os neutrófilos, os mononucleares e a exsudação ( $p < 0,01$ ) (Figura 9). A fração EtOH (10 e 25 mg/kg) não apresentou modificações nos parâmetros inflamatórios analisados ( $p > 0,05$ ) (Figura 9).

A fração hexano (HEX), nas doses de 25 e 50 mg/kg, também demonstrou importante efeito anti-inflamatório, pois diminuiu significativamente a migração dos leucócitos e dos neutrófilos ( $p < 0,01$ ) (Figuras 10A e 10B). Esta fração na dose de 50 mg/kg também inibiu os mononucleares e a exsudação ( $p < 0,05$ ) (Figuras 10C e 10D). Esta mesma fração, na dose de 10 mg/kg, não inibiu a inflamação causada pela carragenina ( $p > 0,05$ ) (Figura 10).

A fração acetato de etila (AcOEt) demonstrou efeito anti-inflamatório similar ao da fração HEX. Esta fração, nas doses de 25 e 50 mg/kg, foi capaz de inibir a migração leucocitária, os neutrófilos, os mononucleares e a exsudação ( $p < 0,01$ ) (Figura 11). A fração AcOEt (10 mg/kg) não alterou nenhum dos parâmetros inflamatórios analisados ( $p > 0,05$ ) (Figura 11).

Entre as frações testadas, as frações AcOEt e HEX foram mais efetivas em inibir os leucócitos e a exsudação quando comparadas a fração EtOH, isto porque doses menores destas frações (25 mg/kg) inibiram os mesmos parâmetros inflamatórios estudados que doses maiores (50 mg/kg) da fração EtOH.

Na etapa seguinte, a partir do EBSO e da fração AcOEt, foram isolados e purificados os compostos: carnosol e ácido

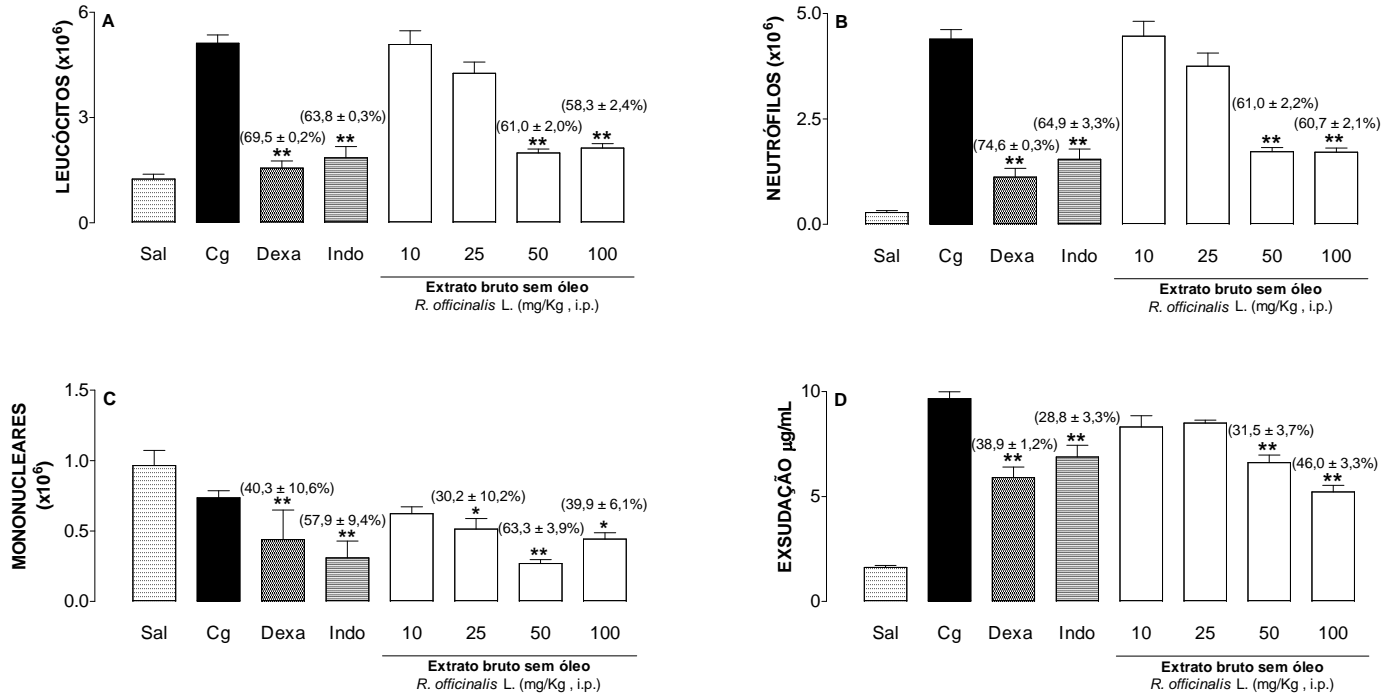
rosmarínico, que também foram estudados para avaliar suas potenciais propriedades anti-inflamatórias.

O carnosol (CAR) nas doses de 2,5-10 mg/kg, também mostrou ser efetivo em reduzir a migração leucocitária, os neutrófilos, os mononucleares e a exsudação ( $p < 0,01$ )(Figura 12). O CAR, na dose de 1 mg/kg não modificou os parâmetros inflamatórios estudados ( $p > 0,05$ ) (Figura 12).

O ácido rosmarínico (RA) também demonstrou efeito anti-inflamatório, uma vez que este composto nas doses de 2,5-10 mg/kg foi capaz de inibir a migração leucocitária, os neutrófilos e os mononucleares ( $p < 0,05$ ) (Figuras 13A, 13B e 13C). Além disso, nas doses de 5 e 10 mg/kg este composto também inibiu a exsudação ( $p < 0,05$ ) (Figura 13D).

O estudo da curva dose-resposta demonstrou que as melhores doses do EBSO, frações e compostos isolados que inibiram os parâmetros inflamatórios estudados foram as seguintes: EBSO: 50 mg/kg, EtOH: 50 mg/kg, HEX: 25 mg/kg, AcOEt: 25 mg/kg, CA: 2,5 mg/kg e RA: 5 mg/kg. Além disso, o estudo da curva tempo-resposta mostrou que o material vegetal foi eficaz em inibir os parâmetros inflamatórios (leucócitos e exsudação) quando administrado 0,5 h antes da carragenina (resultados não apresentados). A partir destes dois estudos, estas doses e o tempo de tratamento prévio foram utilizados para a análise de outros parâmetros inflamatórios.

Como esperado, a dexametasona (0.5 mg/kg, i.p.) e a indometacina (5.0 mg/kg, i.p.) inibiram significativamente a migração leucocitária, os neutrófilos, os mononucleares e a exsudação ( $p < 0,05$ ), respectivamente, na resposta inflamatória induzida por carragenina (Figuras 8 a 13).



**Figura 8** - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO) (10 - 100 mg/kg) obtidos da *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.

Efeito do EBSO sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Sal = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Dunnett e/ou teste t de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

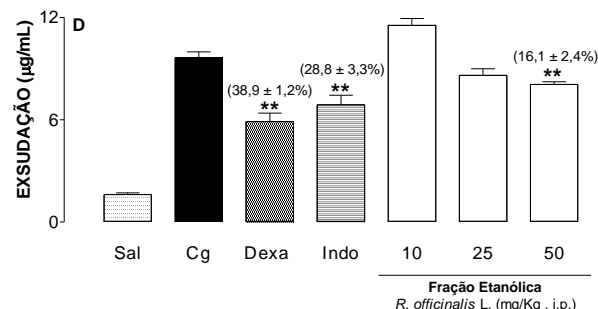
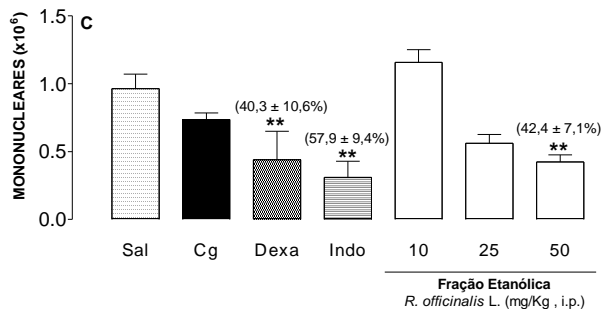
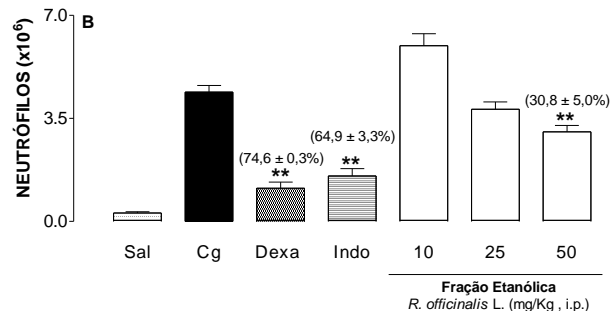
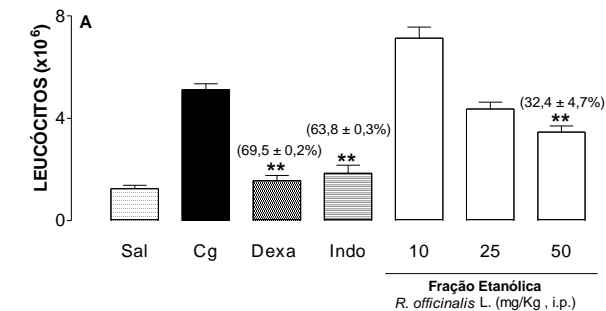


Figura 9 - Efeito da fração etanólica (EtOH) (10 - 50 mg/kg) obtidos da *R. officinalis* L., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.

Efeito da fração EtOH sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Sal = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Dunnett e/ou teste t de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. \*\*  $p < 0,01$ .



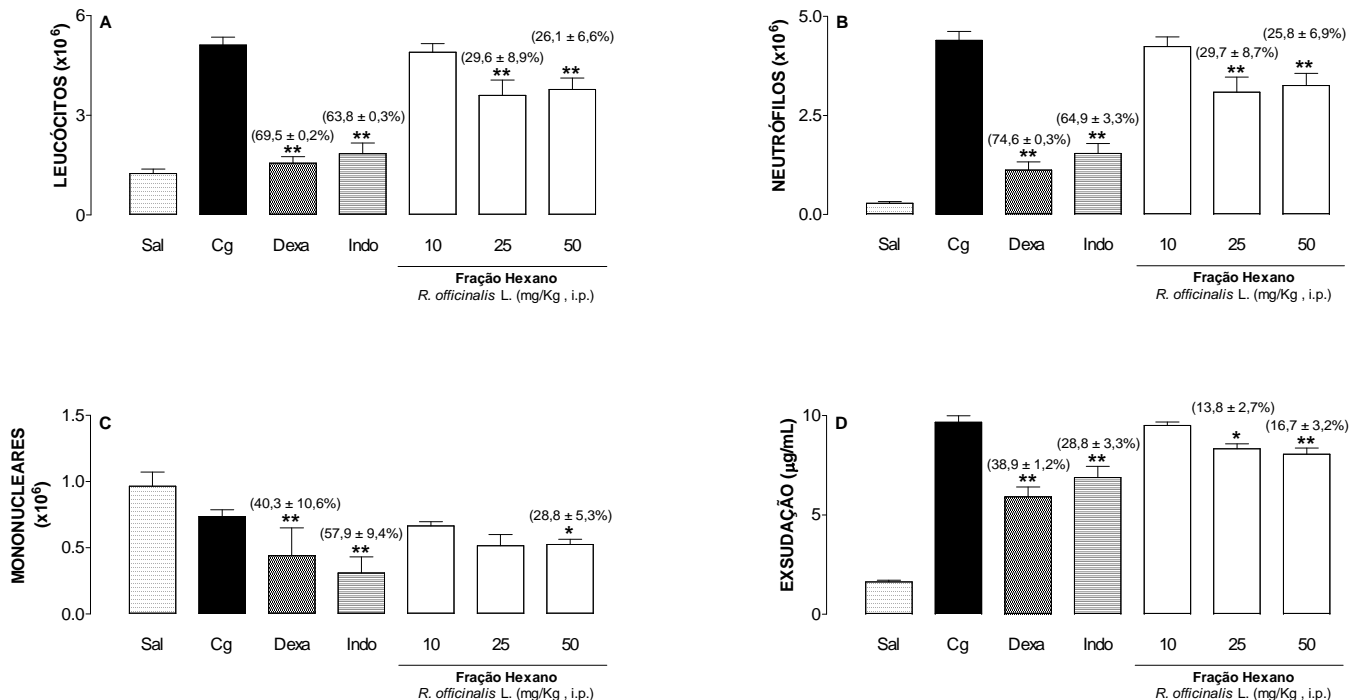


Figura 10 - Efeito da fração hexano (HEX) (10 - 50 mg/kg) obtidos da *R. officinalis* L., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurial (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.

Efeito da fração HEX sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Sal = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.), As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Dunnett e/ou teste t de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

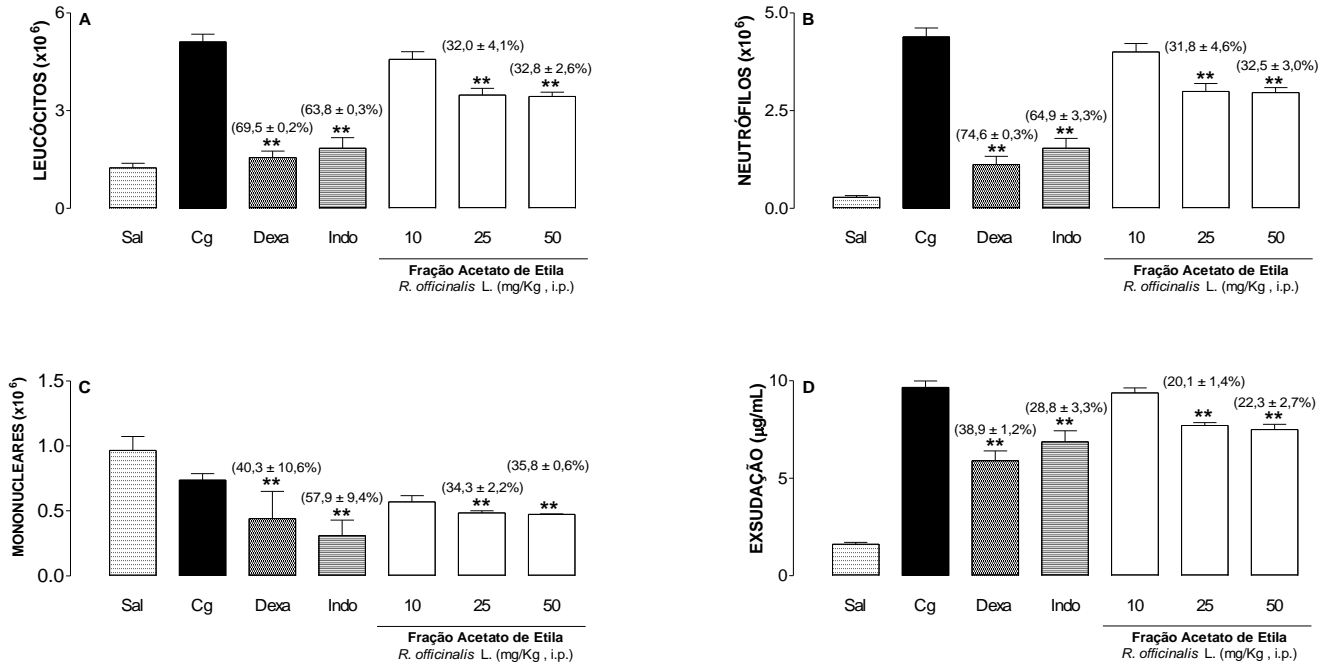


Figura 11 - Efeito da fração acetato de etila (AcOEt) (10 - 50 mg/kg) obtidos da *R. officinalis* L., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurial (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.

Efeito da fração AcOEt sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Sal = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.), As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Dunnett e/ou teste t de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. \*\*  $p < 0,01$ .

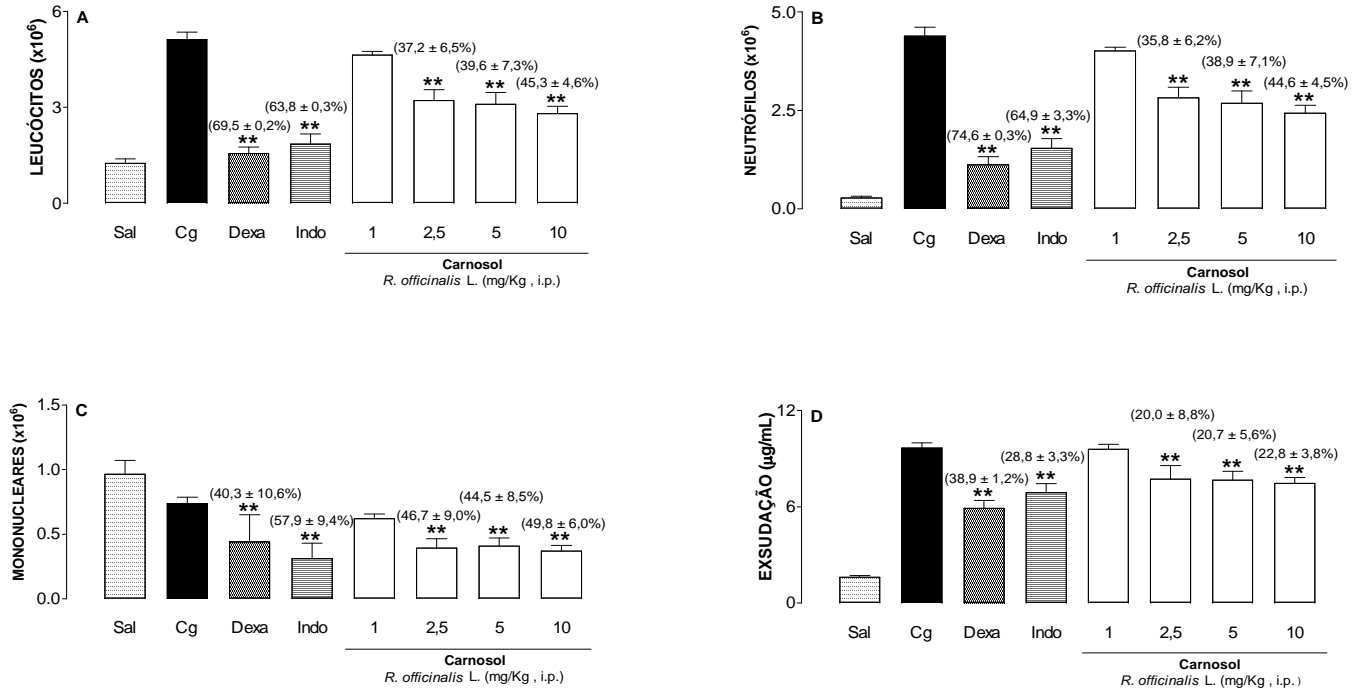


Figura 12 - Efeito do Carnosol (CAR) (1 - 10 mg/kg) obtidos da fração AcOEt da *R. officinalis* L., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.

Efeito do Carnosol sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Sal = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Dunnett e/ou teste t de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. \*\*  $p < 0,01$ .

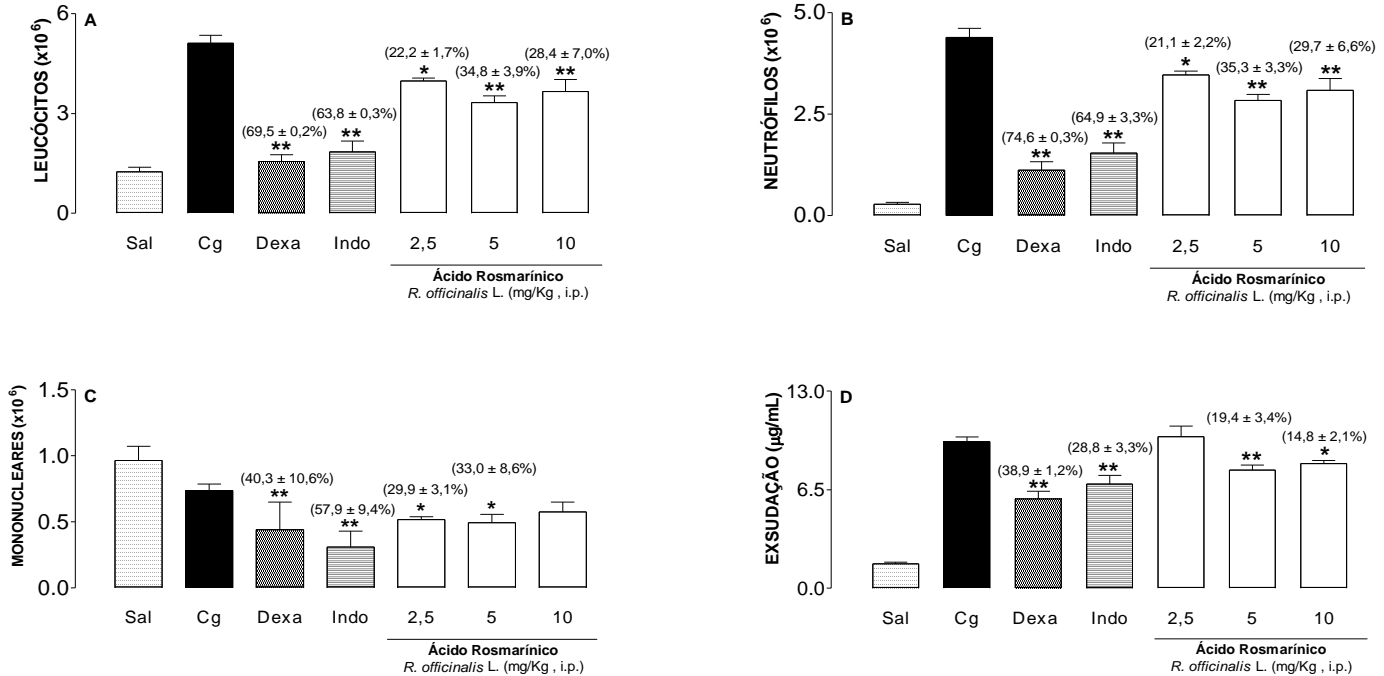


Figura 13 - Efeito do Ácido Rosmarínico (RA) (2,5 - 10 mg/kg) obtidos do EBSO da *R. officinalis* L., administrado por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.) no modelo da pleurisia em camundongos.

Efeito do Ácido Rosmarínico sobre leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C), exsudação (D). Sal = grupo controle negativo (animais tratados somente com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados somente com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.), As colunas verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. e os asteriscos, as diferenças estatísticas (Dunnett e/ou teste t de *Student*). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Com os resultados das curvas-dose resposta, obtiveram-se as melhores doses do EBSO, frações e compostos isolados da *Rosmarinus officinalis* L., ou seja, menores doses efetivas em inibir os leucócitos e a exsudação, como mostrados na tabela 4 para a dosagens das enzimas e mediadores inflamatórios.

**Tabela 4** – Melhores doses e tempo de tratamento prévio do Extrato bruto sem óleo, fração etanólica, fração hexano, fração acetato de etila, carnosol e ácido rosmarínico isolados da *Rosmarinus officinalis* L.

<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Melhor Dose	Tempo de tratamento prévio
Extrato bruto sem óleo	50 mg/kg	0,5 h
Fração etanólica	50 mg/kg	0,5 h
Fração hexano	25 mg/kg	0,5 h
Fração acetato de etila	25 mg/kg	0,5 h
Carnosol	2,5 mg/kg	0,5 h
Ácido Rosmarínico	5 mg/kg	0,5 h

#### 4.3 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

O tratamento prévio (0,5 h) dos animais com as melhores doses do EBSO, frações e compostos isolados da *Rosmarinus officinalis* L. causou uma redução significativa da atividade da MPO ( $p < 0,01$ ) (Figura 14).

A dexametasona e a indometacina também reduziram significativamente a atividade da MPO ( $p < 0,01$ ) (Figura 14).

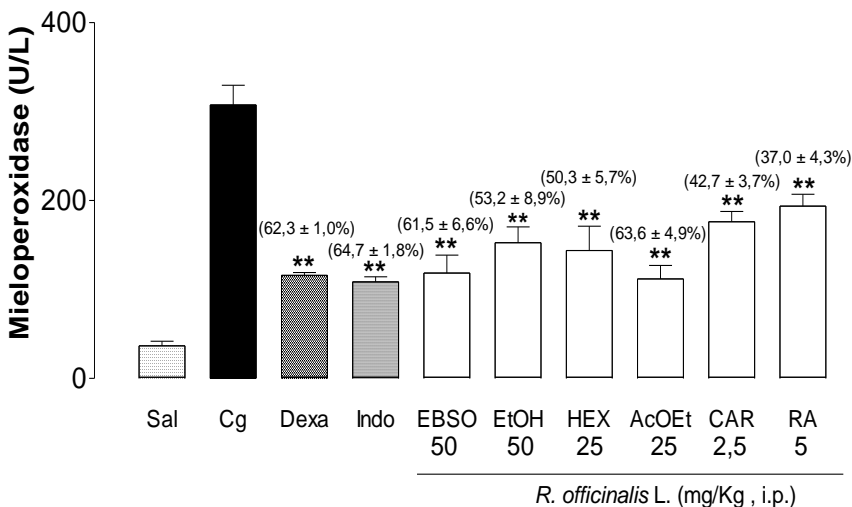


Figura 14 - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO).

Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média ± e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas (Dunnett e/ou Teste t de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.4 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA-DEAMINASE

As melhores doses do EBSO, as frações e os compostos isolados da *Rosmarinus officinalis* L. inibiram significativamente a atividade da ADA ( $p < 0,05$ ) (Figura 15).

Os fármacos de referência, dexametasona e indometacina, também reduziram esta enzima pró-inflamatória ( $p < 0,01$ ) (Figura 15).

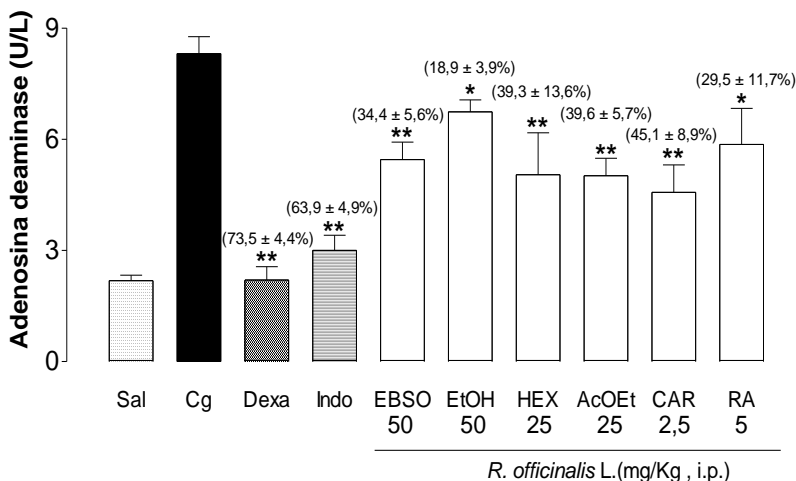


Figura 15 - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre a atividade da adenosina-deaminase (ADA).

Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média ± e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas (Dunnett e/ou Teste t de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.5 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NITRITO/NITRATO)

O extrato bruto sem óleo, frações e compostos isolados da *Rosmarinus officinalis* L. em suas melhores doses, diminuíram significativamente a concentração dos metabólitos do óxido nítrico (NO<sub>x</sub>) ( $p < 0,05$ ) (Figura 16).

Os fármacos de referência anti-inflamatória também suprimiram as concentrações de nitrito/nitrato ( $p < 0,01$ ) (Figura 16).

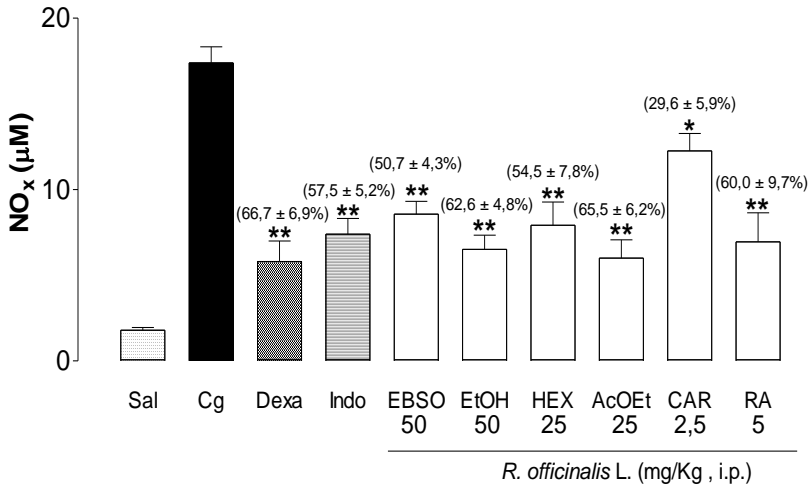


Figura 16 - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L (*R. officinalis* L.), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NO<sub>x</sub>).

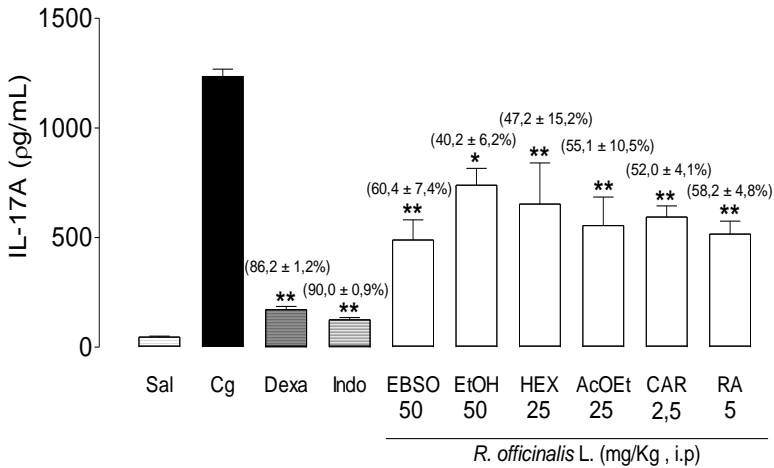
Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média ± e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas (Dunnett e/ou Teste t de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .



#### 4.6 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE IL-17A E IL-10

Neste estudo experimental foi observado que o EBSO, frações e compostos isolados da *Rosmarinus officinalis* L. reduziram as concentrações de IL-17A ( $p < 0,05$ ) (Figura 17). Em contrapartida, nas mesmas condições experimentais, foi observado um aumento significativo nas concentrações de IL-10 (citocina anti-inflamatória) em comparação com o grupo tratado com carragenina ( $p < 0,05$ ) (Figura 18). As frações EtOH e HEX não aumentaram significativamente a concentração desta citocina anti-inflamatória ( $p > 0,05$ ) (Figura 18).

Dexametasona e indometacina também modificaram as concentrações das citocinas analisadas ( $p < 0,01$ ) (Figuras 17 e 18).



**Figura 17** - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre as concentrações de interleucina-17A (IL-17A).

Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média ± e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas (Dunnett e/ou Teste t de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

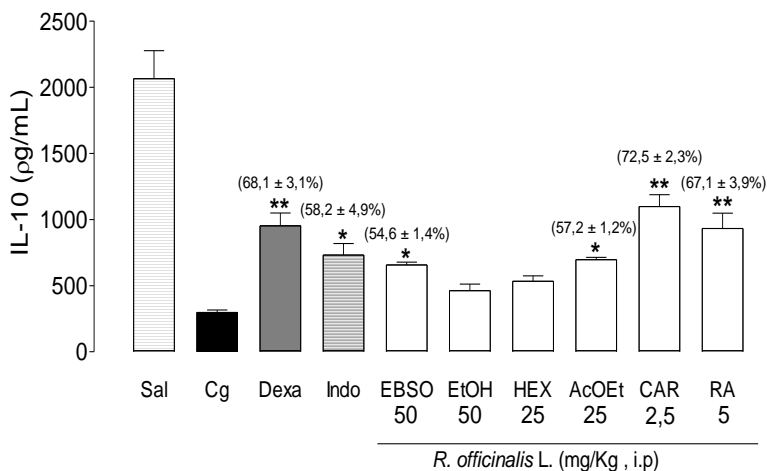


Figura 18 - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (i.pl.) sobre as concentrações de interleucina-10 (IL-10).

Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média ± e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas (Dunnett e/ou Teste *t* de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de aumento. N = 5 animais. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.7 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE A TRANSCRIÇÃO DO RNAm DAS CITOCINAS IL-17A E IL-10.

Para verificar se o material vegetal poderia ter alterado não somente a biosíntese das citocinas, mas também a transcrição do RNAm para as mesmas citocinas, a análise do RNAm foi realizada.

Os resultados mostraram que, no processo inflamatório induzido pela carragenina, o EBSO, frações e compostos isolados da *Rosmarinus officinalis* L. reduziram de forma significativa a transcrição do RNAm da IL-17 ( $p < 0,01$ ) (Figura 19). Nas mesmas condições experimentais, verificou-se que o EBSO, a fração AcOEt e compostos isolados da *R. officinalis* L. aumentaram significativamente a transcrição do RNAm da IL-10 ( $p < 0,05$ ) (Figura 20). A fração EtOH e HEX, nas doses de 50 e 25 mg/kg, não modificaram o parâmetro estudado ( $p > 0,05$ ) (Figura 20).

A dexametasona e a indometacina, fármacos de referência anti-inflamatório, reduziram a transcrição do RNAm da citocina IL-17, e aumentaram a transcrição do mRNA da citocina IL-10 ( $p < 0,01$ ) (Figuras 19 e 20).

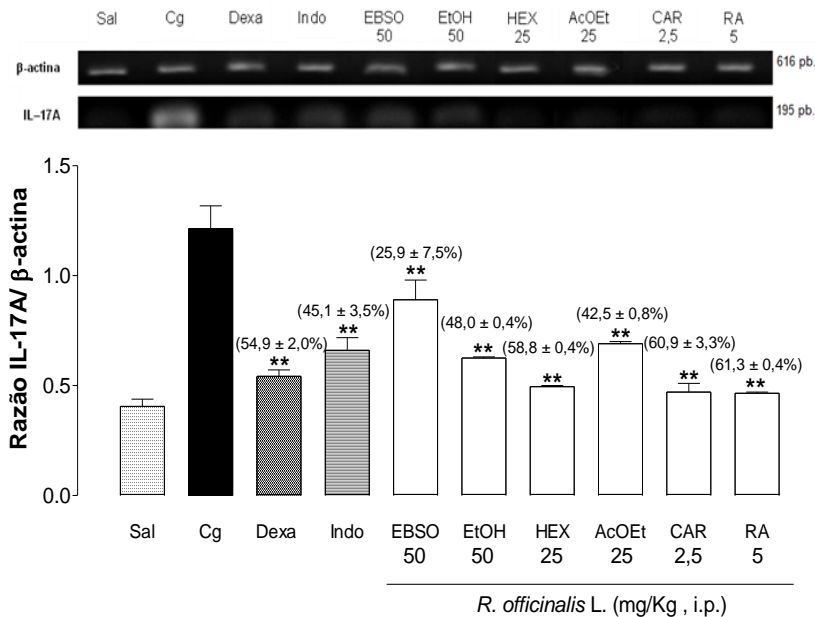
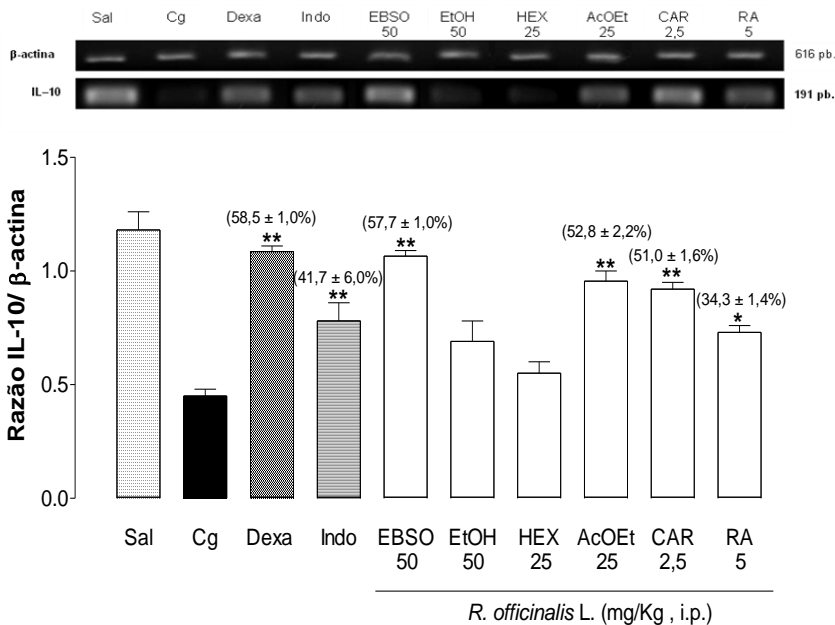


Figura 19 - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre a transcrição do RNAm para a citocina interleucina-17A (IL-17A).

Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média ± e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas (Dunnett e/ou Teste *t* de Student). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de inibição. N = 5 animais. \*\*  $p < 0,01$ . Inset, representa a visualização dos produtos de amplificação para o RNAm para a IL-17A (RT-PCR) em gel de agarose corados com brometo de etídio.



**Figura 20** - Efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO: 50 mg/kg), fração etanólica (EtOH: 50 mg/kg), fração hexano (HEX: 25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 25 mg/kg), carnosol (CAR: 2,5 mg/kg) e ácido rosmarínico (RA: 5 mg/kg) isolados da *Rosmarinus officinalis* L., administrados por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação pela carragenina (1%) administrada por via intrapleurar (1%, i.pl.) sobre a transcrição do RNAm para a citocina interleucina-10 (IL-10).

Sal = grupo controle negativo (animais tratados apenas com NaCl 0,95%, i.pl.), Cg = grupo controle positivo (animais tratados apenas com carragenina (1%), i.pl.), Dexa = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Indo = animais tratados previamente com indometacina (5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média ± e.p.m. e os asteriscos as diferenças estatísticas (Dunnett e/ou Teste *t* de *Student*). Os valores entre parênteses correspondem aos percentuais de aumento. N = 5 animais. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ . *Inset*, representa a visualização dos produtos de amplificação para o RNAm para a IL-10 (RT-PCR) em gel de agarose corados com brometo de etídio.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se o efeito do extrato bruto sem óleo (EBSO), obtido das partes aéreas da *Rosmarinus officinalis* L., suas frações: etanólica (EtOH), hexano (HEX) e acetato de etila (AcOEt), e os compostos isolados: carnosol (CAR) e ácido rosmarínico (RA) administrados por via intraperitoneal (i.p.), no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

Os resultados demonstraram que a administração sistêmica do extrato bruto sem óleo da *R. officinalis* L. e suas frações, apresentaram importante atividade anti-inflamatória. Este efeito foi relacionado com a inibição do influxo de leucócitos principalmente de neutrófilos, além da inibição da exsudação. A modulação desta resposta foi associada a diminuição da atividade das enzimas MPO e ADA, mediadores pró-inflamatórios como NO e IL-17A, bem como o aumento da citocina anti-inflamatória: IL-10. Resultados semelhantes foram observados com o tratamento dos animais com dexametasona e/ou indometacina.

O extrato bruto sem óleo da *Rosmarinus officinalis* L. e suas frações foram efetivos em inibir a migração leucocitária na cavidade pleural e, estes efeitos foram principalmente devido à inibição de neutrófilos. Estas células estão envolvidas na resposta inflamatória aguda (NAUSEEF, 2007), sendo consideradas potentes células inflamatórias que, podem causar dano tecidual (NATHAN, 2006).

MARZOCCO et al. (2004) demonstraram que a metilguanidina (um inibidor da NOS) é capaz de diminuir da migração de neutrófilos, bem como inibição da enzima MPO usando o modelo da pleurisia e o modelo do edema de pata, ambos induzidos pela carragenina, em ratos e, conseqüentemente uma supressão da resposta inflamatória aguda. ZHANG et al. (2010) e XIE et al. (2012) demonstraram que o ácido clorogênico (polifenol obtido da dieta) e os polissacarídeos de plantas (obtidos da *Bupleurum chinense*) foram capazes de reduzir a migração neutrofílica, bem como a atividade da enzima mieloperoxidase, respectivamente, no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo

(LPS) em camundongos, gerando uma resposta protetora para este tipo de lesão. Além disso, outros estudos demonstraram que extratos vegetais de *Rosmarinus officinalis* L. e *Esenbeckia leiocarpa* Engl inibiram a migração leucocitária, à custa de neutrófilos, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos e, esta diminuição foi associado com a inibição da atividade das enzimas mieloperoxidase e adenosina-deaminase (BENINCÁ et al., 2011; POZZATTI et al., 2011), resultados estes que corroboram com os encontrados no presente estudo.

Com relação à MPO, esta é uma enzima envolvida na regulação da homeostasia celular e tem papel fundamental nas doenças inflamatórias agudas (LAU; BALDUS, 2006). Concentrações aumentadas de MPO já foram encontradas em diversas doenças de caráter inflamatório, como por exemplo: aterosclerose, fibrose cística, doenças renais, artrites e vasculites, entre outros (PROKOPOWICZ et al., 2012). Além disso, sabe-se que a MPO é uma enzima armazenada nos grânulos azurófilos, liberadas por neutrófilos ativados, sendo, portanto, utilizada como marcador de recrutamento e ativação de leucócitos, isto porque ela consiste em uma das principais fontes enzimáticas promotoras na formação de espécies reativas de oxigênio (VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009). Desta forma, a inibição da atividade da MPO demonstra que a *Rosmarinus officinalis* L. inibiu tanto o influxo de leucócitos no local da inflamação, quanto à ativação destas células (FRODE; MEDEIROS, 2001).

A atividade anti-inflamatória da *Rosmarinus officinalis* L. também foi associada a diminuição da adenosina deaminase (ADA). A ADA é uma enzima que participa no metabolismo das purinas catalizando irreversivelmente a desaminação da adenosina e da desoxiadenosina em inosina e desoxiinosina, respectivamente (KUNO et al., 2006). A inibição da ADA promove um aumento na concentração de adenosina circulante e, esta por sua vez, é um mediador que pode apresentar atividade pró- ou anti-inflamatória dependendo do tipo de receptor ativado de adenosina. Os receptores de adenosina são classificados em quatro diferentes subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, sendo a atividade anti-inflamatória da adenosina é mediada principalmente pela ativação do receptor A<sub>2A</sub> (CARUSO; HOLGATE; POLOSA, 2006; SPICUZZA; DI MARIA; POLOSA 2006).



KUNO et al. (2006) demonstraram que o inibidor específico da adenosina deaminase (FR 2349380) seria um possível agente anti-inflamatório, uma vez que ele promove aumento da concentração de adenosina extracelular *in vitro* e diminuição de citocinas pró-inflamatórias e aumento da IL-10 em camundongos BALB/c, induzidos por LPS. NADEEM et al. (2008), em estudos utilizando camundongos deficientes de receptor  $A_{2A}$ , demonstraram que a ativação deste receptor é um mecanismo de sinalização anti-inflamatório endógeno, que reduz a reatividade das vias aéreas e a infiltração de células inflamatórias. Ainda, um estudo usando o canabidiol (canabinóide derivado de planta) demonstrou que este composto possui efeitos anti-inflamatórios em um modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos, e esta modulação estaria associada a um aumento de adenosina extracelular e a sua interação com o receptor  $A_{2A}$  (RIBEIRO et al., 2012). Além disso, esta enzima é considerada um marcador de células mononucleares ativadas (FRODE; MEDEIROS, 2001). Desta forma, apesar de não ter sido estudado a adenosina, bem como os seus receptores, podemos hipotetizar que a inibição da ADA pela *Rosmarinus officinalis* L, poderia resultar em um aumento do mediador adenosina, que atuaria no receptor  $A_{2A}$ , promovendo efeitos anti-inflamatórios. Além disso, o presente estudo também revelou que a inibição desta enzima pela *Rosmarinus officinalis* L. seria devido à supressão de células mononucleares ativadas, reduzindo assim a resposta inflamatória induzida pela carragenina.

Relacionando o EBSO com as frações estudadas, verificou-se que a fração HEX e a fração AcOEt demonstraram melhores resultados de efeito-antiinflamatório em relação a inibição da atividade da MPO e ADA, isto porque estas frações foram capazes de inibir a atividade destas enzimas em doses inferiores (25 mg/Kg para as frações HEX e AcOEt) quando comparadas ao EBSO e a fração EtOH (50 mg/Kg para o EBSO e a fração EtOH).

O extrato bruto sem óleo e as frações obtidas da *Rosmarinus officinalis* L. foram capazes de suprimir a concentração de exsudato na cavidade pleural inflamada pela carragenina, e este efeito foi diretamente relacionado com a liberação de óxido nítrico. O óxido nítrico é um importante mediador que possui efeitos pró-inflamatórios, tais como o

aumento da permeabilidade vascular e infiltração de células inflamatórias (REDINGTON, 2006; TRIPATHI et al., 2007). Em doenças inflamatórias das vias respiratórias, tais como asma, estes efeitos podem contribuir para a progressão da doença (REDINGTON, 2006).

Em um estudo utilizando o modelo da pleurisia induzida por carragenina, em ratos, demonstraram que a administração do inibidor de NOS, L-NAME, diminuiu a concentração de NO<sub>x</sub> e a exsudação (SAKAGUCHI et al., 2006). TALERO et al. (2012) demonstraram que a adrenomedulina, um peptídeo – 52 aminoácidos, foi capaz de inibir o recrutamento de leucócitos no tecido pulmonar, a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS/NOS2) e a produção de óxido nítrico (NO), no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. CHEN et al. (2013) demonstraram que, em um modelo de edema pulmonar induzido por fosgeno (gás) em ratos, o piruvato de etila foi efetivo em reduzir o edema pulmonar e, este efeito foi relacionado há uma diminuição do NO e da PGE, bem como a redução da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e iNOS (NOS2) e ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs).

Assim, os resultados do presente estudo corroboram com os estudos apresentados acima, uma vez que o EBSO e as frações da *Rosmarinus officinalis* L. foram capazes de diminuir a migração leucocitária, bem como a exsudação e a concentração de óxido nítrico, reduzindo, desta forma, parte da resposta inflamatória. Além disso, pode-se dizer que a fração HEX e a fração AcOEt foram mais efetivas em inibir NO<sub>x</sub>, pois doses menores (25 mg/kg para as duas frações) destas frações inibiram este mediador pró-inflamatório quando comparadas ao EBSO e a fração EtOH, onde ambos somente suprimiram este mediador na dose de 50 mg/kg.

Na resposta inflamatória, diferentes mediadores são liberados, dentre os quais se destacam a interleucina-17A (IL-17A), que é uma citocina pró-inflamatória envolvida na resposta imune e na inflamação, pela indução e liberação de outras citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento (PARK; LEE, 2010). A IL17 promove ainda a quimiotaxia e acúmulo de polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, durante a resposta imune inata e adaptativa (XU; CAO, 2010). ZHANG et al. (2009) demonstraram que a IL-17

está relacionada com a uveíte induzida por ovalbumina (OVA) em camundongos, pois o aumento de IL-17 promove a quimiotaxia de neutrófilos, amplificando a resposta inflamatória. Ainda, em modelos experimentais de inflamação pulmonar, tais como a asma, verificou-se que há um aumento na secreção de IL-17, secretado predominantemente por células T<sub>H</sub>17, ocasionando inflamação nos pulmões pela estimulação da imunidade inata e expressão de mediadores inflamatórios, além da ativação e do recrutamento neutrófilos (WANG, LIU, 2008; PARK, LEE, 2010). Além disso, o tratamento de camundongos BALB/c com dexametasona reduziu significativamente a transcrição do RNAm para a citocina IL-17, no modelo de inflamação alérgica das vias aéreas, induzido por OVA (HERBERT et al., 2008). BULLENS et al. (2006) demonstraram em um estudo clínico, que o escarro de pacientes com asma grave e moderada, mesmo que estes pacientes estavam sendo tratados com corticoesteróides, tinham concentrações aumentadas da expressão de RNAm para IL-17A e IL-8 e isto foi correlacionado com o aumento de neutrófilos neste escarro, mostrando assim, que a expressão destas citocinas estão envolvidas na asma neutrofílica.

Deste modo, mais uma vez, os resultados do presente estudo mostraram que o EBSO e as frações obtidas da *Rosmarinus officinalis* L. não só reduziram as concentrações de IL-17A, mas também interferiram na transcrição do RNAm para esta citocina pró-inflamatória. Além disso, pode-se dizer que as frações AcOEt e HEX foram mais efetivas em inibir este parâmetro inflamatório quando comparados ao EBSO e fração EtOH, isto porque as frações AcOEt e HEX reduziram esta citocina em doses inferiores (25 mg/kg para as duas frações) que o EBSO e a fração EtOH (50 mg/kg para o EBSO e fração EtOH).

A inflamação é um processo complexo, pelo qual mediadores pró- e anti-inflamatórios são liberados, e neste contexto a IL-10 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, liberada por neutrófilos, eosinófilos, células T auxiliares (CD4+) e citotóxicas (CD8+) e células B, entre outras e tem a função de inibir a resposta imune inata e/ou adaptativa (SARAIVA; O'GARRA, 2010;. OUYANG et al, 2011).

SHI et al. (2010) e LUO et al. (2011) demonstraram o efeito anti-inflamatório de produtos naturais, glicirrizinato de

monoamônio (derivado do Alcaçuz) e do Biciclol (derivado de uma erva chinesa *Fructus Scisandrae*), no modelo lesão pulmonar aguda induzido por LPS em camundongos e, que esta modulação foi devido a inibição de neutrófilos, MPO e TNF- $\alpha$  no local da inflamação, bem como o aumento de IL-10. NABE, et al. (2012) revelaram que a neutrofilia nas vias aéreas foi regulada pelo aumento na produção de IL-10 e redução de citocinas pró-inflamatórias, no modelo de asma induzido por OVA, em camundongos. Ainda, um estudo desenvolvido por LIU; TONKONOGY; SARTOR (2011) revelaram que camundongos deficientes em IL-10 desenvolveram colite, e esta patologia foi mediada por células T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>17 e, a IL-10 produzida por células Tregs ou APCs que são capazes de suprimir esta colite, mostrando desta forma, que a IL-10 é necessária para a homeostasia da mucosa.

No presente estudo, foi demonstrado que o EBSO e a fração AcOEt da *Rosmarinus officinalis* L. aumentaram as concentrações de IL-10, bem como a transcrição do RNAm para esta citocina. Este efeito foi relacionado à inibição da IL-17A e da migração leucocitária, reduzindo assim a resposta inflamatória induzida pela carragenina. As frações HEX e EtOH não alteraram as concentrações, bem como a expressão de RNAm da citocina IL-10.

Visto no presente estudo que o extrato bruto sem óleo e as frações da *Rosmarinus officinalis* L. apresentaram atividade anti-inflamatória, verificou-se a participação dos compostos isolados: carnosol e ácido rosmarínico, obtidos da fração AcOEt e EBSO respectivamente. Os compostos isolados do material vegetal também mostraram uma atividade anti-inflamatória importante, uma vez que inibiram todos os parâmetros inflamatórios estudados.

O carnosol, obtido da fração AcOEt da *Rosmarinus officinalis* L., já apresenta atividades biológicas conhecidas, tais como antioxidantes, anti-tumoral e anti-inflamatório (JOHNSON, 2011). Um estudo desenvolvido por POECKEL et al. (2008) mostrou que o ácido carnósico e o carnosol inibiram a produção de leucotrienos pró-inflamatórios (5-lipoxigenase) em neutrófilos ativados, e reduziram a formação de espécies reativas de oxigênio e a secreção da elastase de neutrófilos humanos estimulados com o n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). Ainda, LO et al. (2002) demonstraram que o carnosol diminuiu o

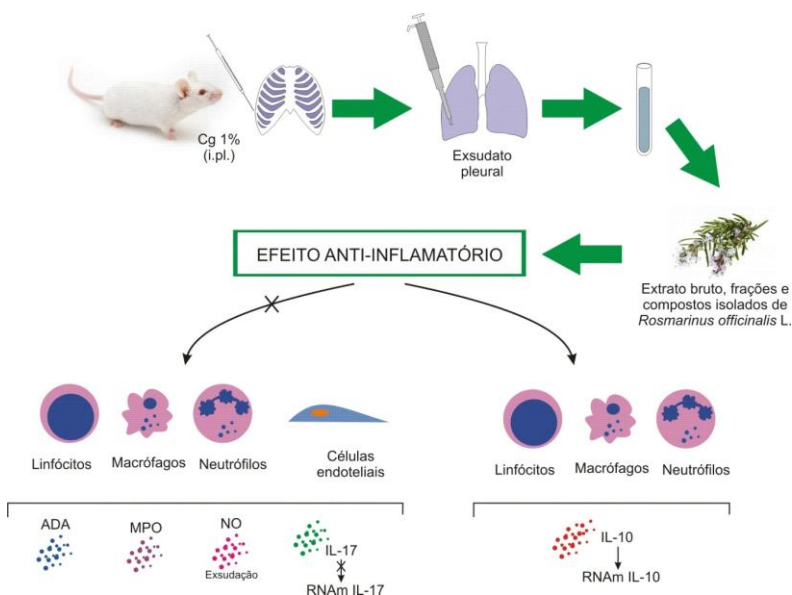
óxido nítrico, bem como a expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), isto devido a inibição do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), em células de macrófagos de camundongos induzidos por LPS. SUBBARAMAIAH et al. (2002) demonstraram em células epiteliais de humanos, que o carnosol inibiu a ativação transcricional da COX-2 mediada pela proteína ativadora-1 AP-1. Além disso, o tratamento prévio dos animais com o carnosol reduziu a expressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , bem como inibiu a COX-2 mas não a ciclooxigenase-1 (COX-1), na inflamação de orelha induzida por formol 12-miristato 13-acetato (PMA), em camundongos (MENGONI et al., 2011).

Em relação ao ácido rosmarínico, isolado do EBSO da *Rosmarinus officinalis* L., SCHENCKEL et al. (2008) demonstraram os possíveis efeitos do ácido rosmarínico sobre a expressão de COX-2 *in vitro* e revelaram que este composto exerceu efeitos anti-inflamatórios e anti-carcinogênico por inibir a expressão gênica da COX-2, dependente da AP-1. SANBONGI et al. (2003) demonstraram que o ácido rosmarínico possui atividade anti-inflamatória, isto porque ele foi capaz de inibir a expressão de IL-1 $\beta$ , proteína inflamatória de macrófagos-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) e proteína quimiotática de macrófagos-1 (MCP-1), além de diminuir a expressão do RNAm para iNOS, utilizando o modelo de lesão pulmonar aguda induzido por partículas de diesel (DEP), em camundongos. Além disso, o ácido rosmarínico diminuiu o número total das células inflamatórias, bem como eosinófilos e as concentrações de IL-4 no lavado broncoalveolar e no pulmão de camundongos, no modelo alérgico das vias aéreas induzida pelo ácaro *B. Tropicalis* (COSTA et al., 2012). Ainda TSUMBU et al. (2012), revelaram que o ácido rosmarínico obtido de extratos aquosos das plantas *Manihot esculenta* Crantz, *Abelmoschus esculentus*, *Hibiscus acetosella* e *Pteridium aquilinum*, foi efetivo em inibir a atividade da MPO, em neutrófilos ativos por formol 12-miristato 13-acetato (PMA).



## 6 CONCLUSÕES

A *Rosmarinus officinalis* L. demonstrou importante efeito anti-inflamatório no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, isto devido principalmente à inibição do influxo de leucócitos e da exsudação. Este efeito parece ser em parte mediado pela inibição das enzimas (MPO e ADA), bem como os mediadores pró-inflamatórios ( $\text{NO}_x$  e IL-17A), além do aumento de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), incluindo a modulação da expressão do RNAm. O carnosol e o ácido rosmarínido, parecem ser, em parte, responsáveis pelo efeito anti-inflamatório apresentado pela *Rosmarinus officinalis* L.



**Figura 21** - Resumo do efeito anti-inflamatório da *Rosmarinus officinalis* L. no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

ADA = adenosina-deaminase, Cg = carragenina, IL-10 = interleucina-10, IL-17 = interleucina-17, MPO = mieloperoxidase,  $\text{NO}_x$  = metabólitos do óxido nítrico, RNAm = ácido ribonucléico mensageiro.

seta contínua (  $\longrightarrow$  ) = sequência, ativação

seta interrompida (  $\dashrightarrow$  ) = inibição





## REFERÊNCIAS

ABU-AL-BASAL, M. A. Healing potential of *Rosmarinus officinalis* L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 131, n. 2, p. 443-450, 2010.

ALBUQUERQUE, U. P., MEDEIROS, P. M., ALMEIDA, A. L. S., MONTEIRO, J. M., NETO, E. M. F. L., MELO, J. G., & SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.

ALTINIER, G.; SOSA, S.; AQUINO, R.P.; MENCHERINI, T.; DELLA, L.R.; TUBARO, A. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 55, n. 5, p. 1718-1723, 2007.

AMIN, A.; HAMZA, A.A. Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus*, and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sciences*, v. 77, p. 266–278, 2005.

ANTONIOLI, L.; COLUCCI, R.; LA MOTTA, C.; TUCCORI, M.; AWWAD, O.; DA SETTIMO, F.; BLANDIZZI, C.; FORNAI, M. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. *Curr Drug Targets*, v. 13, n. 6, p. 842-62, 2012.

ANVARI, F. et al. Tissue-derived proinflammatory effect of adenosine A<sub>2B</sub> receptor in lung ischemia–reperfusion injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 140, n. 4, p. 871 - 877, 2010.

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

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M.H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with

dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 669 - 692, 2009.

3

BAKIREL T, BAKIREL U, KELEŞ OU, ULGEN SG, YARDIBI H. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, p. 64-73. 2008.

BARNES, P.J. Inhaled Corticosteroids. *Pharmaceuticals*, v. 3, p. 514 - 540, 2010.

BENGHIAT, F.S.; CHARBONNIER, L.M.; VOKAER, B.; WILDE, V.; MOINE, A. Interleukin 17-producing T helper cells in alloimmunity. *Transplantation Reviews*, v. 23, p. 11-18, 2009.

BENINCÁ, J.P.; DALMARCO, J.B.; PIZZOLATTI, M.G.; FRÖDE, T.S. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* l. in mice. *Food Chemistry*, v. 124, n. 2, p. 468-475, 2011.

BOLDIZSAR, F.; TALABER, G.; SZABO, M.; BARTIS, D.; PALINKAS, L.; NEMETH, P.; BERKI, T. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology*, v. 215, n. 7, p. 521 - 526, 2010.

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

BOVE, P. F.; VAN DER VLIET, A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 41, p. 515–527, 2006.

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, p. 173 - 228, 1989.

BULLENS, D. M. A.; TRUYEN, E.; COTEUR, L.; DILISSEN, E.; HELLINGS, P. W.; DUPONT, L. J.; CEUPPENS, J. L.K. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven

inflammation and granulocytic influx?. *Respiratory Research*, v. 7, n. 135, p. 1-9, 2006.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep*, v. 25, p. 475–516, 2008.

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

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 131, p. 326–342, 2010.

CARUSO, M.; HOLGATE, S.T.; POLOSA, R.. Adenosine signalling in airways. *Current Opinion in pharmacology*, vol. 6, pág 251-256, 2006.

CHANG, S. H.; DONG, C. Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation. *Cellular Signalling*. v. 23, n. 7, p. 1069-1075, 2011.

CHEN, H.; BAI, H.; XI, M.; LIU, R.; QIN, X.; LIANG, X.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; LI, W.; HAI, C. Ethyl pyruvate protects rats from phosgene induced pulmonary edema by inhibiting cyclooxygenase2 and inducible nitric oxide synthase expression. *Journal of Applied Toxicology*, v. 33, p. 71–77, 2013.

COMMINS, S.P.; BORISH, L.; STEINKE, J.W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, n. 2, p. 53 - 72, 2010.

COSTA, R.S.; CARNEIRO, T.C.B.; CERQUEIRA-LIMA, A.T.; QUEIROZ, N.V.; ALCÂNTARA-NEVES, N.M.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; VELOZO, E.S.; OLIVEIRA, E.J.; FIGUEIREDO, C.A. *Ocimum gratissimum* Linn. and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway inflammation in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia*

*tropicalis*. *International Immunopharmacology*, v. 13, n. 1, p. 126-134, 2012.

CUA, D.J.; TATO, C.M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, p. 479-489, 2010.

DALE, D.C.; BOXER, L.; LILES, W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, v. 112, n. 4, p. 935 - 945, 2008.

DALMARCO, E.M.; ASTOLFI, G.; LIZ, R.; CÓRDOVA, C.M.M.; FRÖDE, T.S. Modulatory effect of mycophenolate mofetil on carrageenan-induced inflammation in the mouse air pouch model. *International Immunopharmacology*, v. 13, p. 476–482, 2012.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 36, n. 2, p. 109 - 126, 2001.

DELANO, D. L.; MONTESINOS, M.C.; DESAI, A.; WILDER, T.; FERNANDEZ, P.; D'EUSTACHIO, P.; WILTSHIRE, T.; CRONSTEIN, B.N.. Genetically-based resistance to the anti-inflammatory effects of methotrexate in the air pouch model of acute inflammation. *Arthritis Rheum.*, v.52, n. 8, p. 2567-2575, 2005.

DESROSIERS, M.D. et al. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *Journal of Immunology*, v. 179, n. 3, p. 1884 - 1892, 2007.

EKMEKCI, O.B.; DONMA, O.; SARDOĞAN, E.; YILDIRIM, N.; UYSAL, O.; DEMIREL, H.; DEMIR, T. Iron, nitric oxide, and myeloperoxidase in asthmatic patients. *Biochemistry (Moscow)*, v. 69, n. 4, p. 462 - 467, 2004.

FAITH, M.; SUKUMARAN, A.; PULIMOOD, A. B.; JACOB, M. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? *Clinica Chimica Acta*, v. 396, n. 1-2, p. 23 - 25, 2008.

FLAMMER, J.R.; ROGATSKY, I. Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. *Molecular Endocrinology*, v. 25, n. 7, p. 1075 - 1086, 2011.

FREDHOLM, B.B. et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews*, 53, n. 4, p. 527-552, 2001.

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

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

GAZONI, L.M. et al. Activation of A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, or A<sub>3</sub> adenosine receptors attenuates lung ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 140, n. 2, p. 440 - 446, 2010.

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

GONZÁLEZ-TRUJANO, M.E.; PEÑA, E.I. ; MARTÍNEZ, A.L.; MORENO, J.; GUEVARA-FEFER, P.; DÉCIGA-CAMPOS, M.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.J. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 111, n. 3, p. 476-482, 2007.

GOSSLAU, A.; LI, S.; HO, C.; CHEN, K. Y.; RAWSON, N.E. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Mol. Nutr. Food Res*, v. 55, p. 74–82, 2011.

GOUGEROT-POCIDALO, M. The neutrophil and systemic inflammation. *Joint Bone Spine*. v. 79, n. 3, p. 209-211, 2012.

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.

HAEGENS, A.; HEERINGA, P.; SUYLEN, R. J. V.; STEELE, C.; ARATANI, Y.; O'DONOGHUE, R. J. J.; MUTSAERS, S. E.; MOSSMAN, B. T.; WOUTERS, E. F. M.; VERNOOY, J. H. J. Myeloperoxidase Deficiency Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Inflammation and Subsequent Cytokine and Chemokine Production. *Journal of Immunology*, v. 182, p. 7990-7996, 2009.

HARVEY, A. L. Natural products in drug Discovery. *Drug Discovery Today*, v. 13, p. 894-901, 2008.

HASKÓ, G.; PACHER, P.; DEITCH, E.A.; VIZI, E. S. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 113, p. 264-275, 2007.

HASKÓ, G.; LINDEN, J.; CRONSTEIN, B.; PACHER, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 7, p. 759-770, 2008.

HASKÓ, G. et al. A<sub>2B</sub> adenosine receptors in immunity and inflammation. *Trends in Immunology*, v. 30, n. 6, p. 263 - 270, 2009.

HENRIQUES, M.G. et al. Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. *British Journal of Pharmacology*, London, v. 99, n. 1, p. 164–168, 1990.

HERBERT, C.; HETTIARATCHI, A.; WEBB, D.C.; THOMAS, P.S.; FOSTER, P.S.; KUMAR, R.K. Suppression of cytokine expression by roflumilast and dexamethasone in a model of chronic asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 38, p. 847-856, 2008.

HOFMANN, S.R.; RÖSEN-WOLFF, A.; TSOKOS, G.C.; HEDRICH, C.M. Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. *Clinical Immunology*, v. 143, n. 2, p. 116-127, 2012.

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

IBARRA, A.; CASES, J.; BILY, A.; HE, K.; BAI, N.; ROLLER, M.; COUSSAERT, A.; RIPOLL, C. Importance of Extract Standardization and *In Vitro/Ex Vivo* Assay Selection for the Evaluation of Antioxidant Activity of Botanicals: A Case Study on Three *Rosmarinus officinalis* L. Extracts. *Journal of Medicinal Food*, v. 13, n. 5, p. 1167–1175, 2010.

IMPELLIZZERI, D. et al. CGS 21680, an agonist of the adenosine (A<sub>2A</sub>) receptor, decreases acute lung inflammation. *European Journal of Pharmacology*, v. 668, n. 1-2, p. 305 - 316, 2011.

JOHNSON, J. J. *Carnosol*: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Letters*, Elsevier, v. 305, p. 1-7, 2011.

KONTOGIANNI A, V.G.; TOMIC, G.; NIKOLIC, I.; NERANTZAKI, A.A.; SAYYAD, N.; STOSIC-GRUJICIC, S.; STOJANOVIC, I.; GEROTHANASSIS, I.P.; TZAKOS, A.G. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, v. 136, p. 120–129, 2013.

KIM, M. et al. Kidney-specific reconstitution of the A<sub>1</sub> adenosine receptor in A<sub>1</sub> adenosine receptor knockout mice reduces renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney International*, v. 75, n. 8, p. 809 - 823, 2009.

KRENKE, R.; KORCZYŃSKI, P. Use of pleural fluid levels of adenosine deaminase and interferon gamma in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Current opinion in pulmonary medicine*, v. 16, n. 4, p. 367-75, 2010.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *European Journal of Pharmacology*, v. 616, n. 1 - 3, p. 7 - 15, 2009.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*, v. 10, n. 11, p. 1325-1334, 2010.

KUNO, M.; SEKI, N.; TSUJIMOTO, S.; NAKANISHI, I.; KINOSHITA, T.; NAKAMURA, K.; TERASAKA, T.; NISHIO, N.; SATO, A.; FUJII, T. Anti-inflammatory activity of non-nucleoside adenosine deaminase inhibitor FR234938. *European Journal of Pharmacology*, v. 534, p. 241–249, 2006.

LAINE, L.; SMITH, R.; MIN, K.; CHEN, C.; DUBOIS, R. W. Systematic review: the lower gastrointestinal adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacology Therapy*, v. 24, n. 5, p. 751-67, 2006.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 111, n. 1, p. 16–26, 2006.

LEE, K.H. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. *Journal of Natural Products*, v. 73, n. 3, p. 500 - 516, 2010.

LEE, J. J.; JIN, Y. R.; LEE, J. H.; YU, J. Y.; HAN, X. H.; OH, K. W.; HONG, J. T.; KIM, T. J.; YUN, Y. P. Antiplatelet activity of carnosic acid, a phenolic diterpene from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica*, v. 73, p. 121-127. 2007

LIU, B.; TONKONOGY, S. L.; SARTOR, R. B. Antigen-Presenting Cell Production of IL-10 Inhibits T-Helper 1 and 17 Cell Responses and Suppresses Colitis in Mice. *Gastroenterology*, v. 141, p. 653-662, 2011.

LO, A.H.; LIANG, Y.C.; LIN-SHIAU, S.Y.; HO, C.T.; LIN, J.K. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric



oxide synthase through downregulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, v. 23, p. 983–991, 2002.

LUO, Y.; ZHANG, B.; XU, D.; LIU, Y.; DONG, M.; ZHAO, P.; LI, Z. Protective effect of bicyclol on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 24, p.240-246, 2011.

MACHADO, D.G.; BETTIO, L.E.B.; CUNHA, M.P.; CAPRA, J.C.; DALMARCO, J.B.; PIZZOLATTI, M.G.; RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 33, n. 4, p. 642-650, 2009.

MALLE, E.; FURTMÜLLER, P. G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British Journal of Pharmacology*, v. 152, n. 6, p. 838 - 854, 2007.

MARZOCCO, S.; PAOLA, R. D.; SERRAINO, I.; SORRENTINO, R.; MELI, R.; MATTACERASO, G.; CUZZOCREA, S.; PINTO, A.; AUTORE, G. Effect of methylguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in the rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 484, p. 341– 350, 2004.

MCGETTIGAN, P.; HENRY, D. Cardiovascular risk with non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review of population-based controlled observational studies. *PLoS Med*, v. 8, n9, p. e1001098.

MEDZHITOV, R. Review Article Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 24, p. 428 - 435, 2008.

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

MELO, J.G.; AMORIM, E.L.C; ALBUQUERQUE, U.P. Native medicinal plants commercialized in Brazil – priorities for conservation. *Environmental Monitoring Assessment*, v. 156, n. 1-4, p. 567 - 580, 2009.

MENZIONI, E.S.; VICHERA, G.; RIGANO, L.A.; RODRIGUEZ-PUEBLA, M.L.; GALLIANO, S.R.; CAFFERATA, E.E.; PIVETTA, O.H.; MORENO, S.; VOJNOV, A.A. Suppression of COX-2, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. *Fitoterapia*, v. 82, p. 414–421, 2011.

MIOSSEC, P.; KOLLS, J. K. Targeting IL-17 and T<sub>H</sub>17 cells in chronic inflammation. *Nature Reviews*, v. 11, p. 763-776, 2012.

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

MISHRA, B.B.; TIWARI, V.K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 10, p. 4769 - 4807, 2011.

MONTESEIRÍN, J. Neutrophils and Asthma. *Journal Investigational Allergology and Clinical Immunology*, v. 19, n. 5, p. 340-354, 2009.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews*, v. 226, n. 1, p. 205–218, 2008.

NABE, T.; IKEDO, A.; HOSOKAWA, F.; KISHIMA, M.; FUJII, M.; MIZUTANI, N.; YOSHINO, S.; ISHIHARA, K.; AKIBA, S.; CHAPLIN D.D. Regulatory role of antigen-induced interleukin-10, produced by CD4<sup>+</sup> T cells, in airway neutrophilia in a murine model for asthma. *European Journal of Pharmacology*, v. 677, p. 154-162, 2012.

NADEEM, A.; FAN, M.; ANSARI, H.R.; LEDENT, C.; JAMAL-MUSTAFA, S. *Enhanced airway reactivity and inflammation in A2A adenosine receptor-deficient allergic mice*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L1335–L1344

NAGY, G.; CLARK, J. M.; BUZAS, E. I.; GORMAN, C. L.; COPE, A. P. Nitric oxide, chornia inflammation and autoimunity. *Immunology Letters*, v. 111, p. 1-5, 2007.

NAKAMACHI, Y.; KOSHIBA, M.; NAKAZAWA, T.; HATACHI, S.; SAURA, R.; KUROSAKA, M.; KUSAKA, H.; KUMAGAI, S.. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*, v. 48, p. 668-674, 2003.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Ver Immunology*, v. 6, p. 173–82, 2006.

NAUSEEF, W. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological Reviews*, Copenhagen, v. 219, p. 88–102, 2007.

NEMBRINI, C.; MARSLAND, B. J.; KOPF, M. IL-17–producing T cells in lung immunity and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 123, n. 5, p. 986-994, 2009.

NGO, S.N.T.; WILLIAMS, D.B.; HEAD, R.J. Rosemary and Cancer Prevention: Preclinical Perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, n. 10, p. 946-954, 2011.

NOLKEMPER, S.; REICHLING, J.; STINTZING, F. C.; CARLE, R.; SCHNITZLER, P. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Planta Medica*, v. 72, p.1378-1382. 2006.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N.K.; VALDEZ, P.A.; HYMOWITZ, S.G. Regulation and Functions ofvthe IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annual Review of Immunology*, v. 29, p. 71–109, 2011

PAPAYANNOPOULOS, V.; ZYCHLINSKY, A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends of Immunology*. v. 30, n. 11, p. 513-21, 2009.

PARK, S.E.; SAPKOTA, K.; KIM, S. J. Neuroprotective effect of *Rosmarinus officinalis* extract on human dopaminergic cell line,

SH-SY5Y. *Cellular and molecular neurobiology*, v. 30, n. 5, p. 759-767, 2010.

PARK, S.J.; LEE, Y.C. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. *Respiratory Research*, v. 11, n. 78, 2010.

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

PETERSEN, M.; ABDULLAH, Y.; BENNER, J.; EBERLE, D.; GEHLEN, K.; HÜCHERIG, S.; JANIYAK, V.; KIM, K. H.; SANDER, M.; WEITZEL, C.; WOLTERS, S. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, v. 70, p. 1663–1679, 2009.

PETRONILHO, S.; MARASCHIN, M.; COIMBRA, M. A.; ROCHA, S. M. *In vitro* and *in vivo* studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Industrial Crops and Products*, v. 40, p. 1-12, 2012.

POECKEL, D.; GREINER, C.; VERHOFF, M.; RAU, O.; TAUSCH, L.; HÖRNIG, C.; STEINHILBER, D.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WERZ, O. Carnosic acid and carnosol potentially inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical Pharmacology*, v. 76, p. 91-97, 2008.

POZZATTI, P.; 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. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 63, p. 1091–1102, 2011.

PROKOPOWICZ, Z.; MARCINKIEWICZ, J.; KATZ, D. R.; CHAIN, B. M. Neutrophil Myeloperoxidase: Soldier and Statesman. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 60, n. 1, p. 43-54, 2012.

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

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

REDINGTON, A.E. Modulation of nitric oxide pathways: Therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *European Journal of Pharmacology*, v. 533, p. 263–276, 2006.

RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; VITORETTI, L. B.; MARIANO-SOUZA, D. P.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; AKAMINE, A. T.; ALMEIDA, V. I.; QUEVEDO, J.; DAL-PIZZOL, F.; HALLAK, J. E.; ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; PALERMO-NETO, J. Cannabidiol, a non-psychoactive plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: Role for the adenosine A<sub>2A</sub> receptor. *European Journal of Pharmacology*, v. 678, p. 78-85, 2012.

RYZHOV, S. et al. Effect of A<sub>2B</sub> Adenosine receptor gene ablation on proinflammatory adenosine signaling in mast cells. *The Journal of Immunology*, v. 180, p. 7212 - 7220, 2008.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*. v. 32, n. 10, 2011.

SAKAGUCHI, Y. et al. Effect of combination of nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibitors on carrageenan-induced pleurisy in rats. *Life Sciences*, Amsterdam, v. 79, n. 5, p. 442–447, 2006.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*, Oxford, v. 13, n. 3-4, p. 161-171, 2008.

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

SANBONGI, C.; TAKANO, H.; OSAKABE, N.; SASA, N.; NATSUME, M.; YANAGISAWA, R.; INOUE, K.; KATO, Y.; OSAWA, T.; YOSHIKAWA, T. Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 34, n. 8, p. 1060–1069, 2003.

SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, p. 170–181, 2010.

SCHECKEL, K.A.; DEGNER, S.C.; ROMAGNOLO, D.F. Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines. *J Nutr*, v. 138, p. 2098–2105, 2008.

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

SEDGWICK, A.D.; LEES, P. A comparison of air pouch, songe and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents and Actions*, v. 18, n. 3-4, p. 439 - 446, 1986.

SHI, J.; MAO, L.; JIANG, R.; QIAN, Y.; TANG, H.; CHEN, J. Monoammonium glycyrrhizinate inhibited the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice. *International Immunopharmacology*, n. 10, p. 1235–1241, 2010.

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

SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. *Journal of Pathology and Bacteriology*, London, v. 72, p. 367-380, 1956.

SPICUZZA, L.; DI MARIA, G.; POLOSA, R.. adenosine in the airways: Implications and applications. *European Journal of pharmacology*, v. 533, p. 77-88, 2006.

STEWART, L.; KATIAL, R. K. Exhaled Nitric Oxide. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, v. 32, n. 3, p. 347–362, 2012

SUBBARAMAIAH, K.; COLE, P. A.; DANNENBERG, A. J. Retinoids and Carnosol Suppress Cyclooxygenase-2 Transcription by CREB-binding Protein/p300-dependent and -independent Mechanisms. *Cancer research*, v. 62, p. 2522-2530, 2002.

SUGIURA, H.; ICHINOSE, M. Nitrate stress in inflammatory lung diseases. *Nitric Oxide*, v. 25, p. 138–144, 2011.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacological Reports*, v. 59, n. 3, p. 247 - 258, 2007.

SUN, C. X.; YOUNG, H. W.; MOLINA, J. G.; VOLMER, J. B.; SCHENERMANN, J.; BLACKBURN, M.R..A protective role for the A1 adenosine receptor in adenosine-dependent pulmonary injury. *The journal of Clinical Investigation*, v. 115(1), p. 35-43, 2005.

TAI, J.; CHEUNG, S.; WU, M.; HASMAN, D. Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine*, v. 19, p. 436– 443, 2012.

TAKAKI, I.; BERSANI-AMADO, L.E.; VENDRUSCOLO, A.; SARTORETTO, S.M.; DINIZ, S.P.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *Journal of Medicinal Food*, Larchmont, v. 11, n. 4, p. 741-746, 2008.

TALERO, E.; DI PAOLA, R.; MAZZON, E.; EMANUELA, E.; MOTILVA, V.; CUZZOCREA, S. Anti-Inflammatory Effects of Adrenomedullin on Acute Lung Injury Induced by Carrageenan in Mice, *Mediators of Inflammation*, v.2012, p. 717-851, 2012.

TELLES, R. W.; FERREIRA, G. A.; DA SILVA, N. P.; SATO, E. I. Increased plasma myeloperoxidase levels in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology International*, v. 30, n. 6, p. 779-84, 2010.

THOMAS, D.D. et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 45, n. 1, p. 18 - 31, 2008.

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 51, p. 443–452, 2007.

TSUMBU, C.N.; DEBY-DUPONT, G.; TITS, M.; ANGENOT, L.; FREDERICH, M.; KOHNEN, S.; MOUITHYS-MICKALAD, A.; SERTEYN, D.; FRANCK, T. Polyphenol Content and Modulatory Activities of Some Tropical Dietary Plant Extracts on the Oxidant Activities of Neutrophils and Myeloperoxidase. *International Journal of Molecular Sciences*, v.13, p. 628-650, 2012.

ULBRICHT, C.; ABRAMS, T. R.; BRIGHAM, A.; CEURVELS, J.; CLUBB, J.; CURTISS, W.; KIRKWOOD, C.D; GIESE, N.; HOEHN, K.; IOVIN, R.; ISAAC, R.; RUSIE, E.; SERRANO, J. M. G.; VARGHESE, M.; WEISSNER, W.; REGINA C. WINDSOR, R.C. An Evidence-Based Systematic Review of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal of Dietary Supplements*, v. 7, n. 4, p. 351-413, 2010.

VAN DER VEEN, B.S.; WINTHER, M.P.J.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, Larchmont, v. 11, n. 11, p. 1-39, 2009.

VARANI, K. et al. Expression and functional role of adenosine receptors in regulating inflammatory responses in human synoviocytes. *British Journal of Pharmacology*, v. 160, n. 1, p. 101 - 115, 2010.



VENTURA-MARTÍNEZ, R.; RIVERO-OSORNO, O.; GÓMEZ, C.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M.E. Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, p. 1528– 1532, 2011.

WANG, Y.; LIU, Y. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. *Current Opinion in Immunology*, v. 20, p. 697–702, 2008.

WANG, Y. et al. Nitric oxide: promoter or suppressor of programmed cell death? *Protein Cell*, v. 1, n. 2, p. 133 - 142, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Traditional medicine, Fact sheet, n. 134, 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>>. Acesso em: 07/12/2012.

XIE, J.; DI, H.; LI, H.; CHENG, X.; ZHANG, Y.; CHEN, D. Bupleurum chinense DC polysaccharides attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Phytomedicine*, v. 19, p. 130– 137, 2012.

XU, S.; CAO, X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunology*, v.7, n.3, p.164-174, 2010.

ZHANG, X.; HUANG, H; YANG, T.; YE, Y.; SHAN, J.; YIN, Z.; LUO, L. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Injury*, v. 41, p. 746–752, 2010.

ZHANG, Z.; ZHONG, W.; SPENCER, D.; CHEN, H.; LU, H.; KAWAGUCHI, T.; ROSENBAUM, J. T. Interleukin-17 causes neutrophil mediated inflammation in ovalbumin-induced uveitis in DO11.10 mice. *Cytokine*, v. 46, n. 1, p. 79-91, 2009.



## **ANEXO A - Protocolo de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) (PP00632)**

### **Resultado de Solicitação de Protocolo**

**Protocolo**

PP00632

**Título**ESTUDO FARMACOLÓGICO ESTUDO FARMACOLÓGICO DA *Rosmarinus officinalis* L. NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS**Data de Entrada**

18/04/2011

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

20/09/2011

**Considerações**

Ofício nº 116/CEUA/PRPE/2011

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

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Tânia Sílvia Fröde/Análises Clínicas/CCS

Prezado(a) Professor(a),

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

- APROVADO, por um ano, para a utilização de 1097 camundongos (*Mus musculus*);
- APROVADO com recomendação de substituição da injeção retroorbital por técnica menos agressiva (consultar pagina da CEUA, métodos alternativos.)
- Procedência do animal: Biotério Central UFSC.

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 20/12/2013**

Data 21/09/2011

**Parecer(es):**

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

## **ANEXO B - Resumos apresentados em anais de congressos**

- 1. ROSA, J. S.** ; FACCHIN, B. M. ; DALMARCO, J.B ; PIZZOLATTI, M.G. ; FRÖDE, T.S. EVIDENCE OF ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS *Rosmarinus officinalis* L. *IN VIVO* EXPERIMENTS. In: IMMUNO - XXXVII Brazilian Congress of Immunology, 2012, Campos do Jordão. Anais do XXXVII Brazilian Congress of Immunology, 2012.
- 2. ROSA, J. S.** ; BENINCA, J. P. ; DALMARCO, J.B ; PIZZOLATTI, M.G. ; FRÖDE, T.S. SYSTEMIC ADMINISTRATION OF *Rosmarinus officinalis* L. ATTENUATES THE INFLAMMATORY RESPONSE IN A MURINE MODEL OF PLEURISY INDUCED BY CARRAGEENAN. In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia - SP. XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012. **(Prêmio: Menção honrosa)**
- 3. FRÖDE, T.S.** ; **ROSA, J. S.** ; FACCHIN, B. M. ; DALMARCO, J.B ; PIZZOLATTI, M.G. . EVIDENCE OF ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OS *Rosmarinus officinalis* L. IN THE MOUSE MODEL OF PLEURISY INDUCED BY CARRAGEENAN. In: Annual Meeting & Clinical Lab Expo - AACC, 2012, Los Angeles, California. Annual Meeting & Clinical Lab Expo - AACC, 2012.
- 4. ROSA, J. S.** ; FACCHIN, B. M. ; DALMARCO, J.B ; PIZZOLATTI, M.G. ; FRÖDE, T.S. . ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF *Rosmarinus officinalis* L. IN A MURINE MODEL OF PLEURISY INDUCED BY CARRAGEENAN. In: IMMUNOFOZ - XXXVI Brazilian Congress of Immunology, 2011, Foz do Iguaçu. Anais do XXXVI Brazilian Congress of Immunology, 2011.

5. FACCHIN, B. M. ; **ROSA, J. S.** ; DALMARCO, J.B ; PIZZOLATTI, M.G. ; FRÖDE, T.S. . ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *Rosmarinus officinalis* L. NO MODELO DE PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS.. In: 21º Seminário de Iniciação Científica da UFSC (SIC-UFSC, 2011, Florianópolis. Anais do 21º Seminário de Iniciação Científica da UFSC (SIC-UFSC), 2011



**ANEXO C** - Comprovante de submissão do artigo: “Systemic administration of *Rosmarinus officinalis* L. attenuates the inflammatory response *in vivo*”, ao periódico *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

Submission  
Confirmation

**DO NOT USE YOUR BROWSER BACK BUTTON. TO EXIT THIS PAGE, PLEASE CLOSE YOUR BROWSER WINDOW OR CLICK ON THE RETURN TO DASHBOARD BUTTON, IF AVAILABLE.**

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

Manuscript ID:	JPP-13-0066
Title:	Systemic administration of <i>Rosmarinus officinalis</i> L. attenuates the inflammatory response <i>in vivo</i> .
Authors:	da Rosa, Julia Facchin, Bruno Dalmarco, Juliana Siqueira, Mariana Micke, Gustavo Dalmarco, Eduardo Pizzolatti, Moacir Frode, Tania
Date Submitted:	25-Jan-2013

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.10.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.  
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)